

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Dragana T. Stanković

**RAZVOJ OBLOŽENIH
SUPERPARAMAGNETNIH NANOČESTICA
OBELEŽENIH ^{99m}Tc I ^{177}Lu
I ISPITIVANJE NJIHOVE EFIKASNOSTI
NA EKSPERIMENTALNOM MODELU
KARCINOMA DOJKE I KOLONA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET



Dragana T. Stanković

**RAZVOJ OBLOŽENIH
SUPERPARAMAGNETNIH NANOČESTICA
OBELEŽENIH ^{99m}Tc I ^{177}Lu
I ISPITIVANJE NJIHOVE EFIKASNOSTI
NA EKSPERIMENTALNOM MODELU
KARCINOMA DOJKE I KOLONA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY



Dragana T. Stanković

**DEVELOPMENT OF COATED
SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLES
LABELED WITH ^{99m}Tc AND ^{177}Lu
AND TESTING THEIR EFFICACY
IN AN EXPERIMENTAL MODEL
OF BREAST AND COLON CARCINOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

Doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za radioizotope i Laboratoriji za teorijsku fiziku i fiziku kondenzovane materije, Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Deo eksperimentalnog rada je urađen u Nacionalnom centru za naučna istraživanja “Demokritos”, u Atini.

Mentori:

dr Miroslav Savić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

dr Magdalena Radović, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke “Vinča”– Institut od
nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Članovi komisije:

dr Jasmina Brborić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

dr Marija Mirković, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke “Vinča”– Institut od
nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Zorana Milanović, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke “Vinča”– Institut od
nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

U Beogradu, _____

Razvoj obloženih superparamagnetnih nanočestica obeleženih sa ^{99m}Tc i ^{177}Lu i ispitivanje njihove efikasnosti na eksperimentalnom modelu karcinoma dojke i kolona

Sažetak

S obzirom na rastuću stopu oboljevanja od malignih bolesti u svetu i nedovoljnu efikasnost postojećih terapija, veliki naponi ulažu se u razvoj novih generacija dijagnostičkih i terapijskih lekova, sa smanjenom tendencijom izazivanja neželjenih reakcija. Nedostatak efikasnih strategija lečenja naglašava potrebu i za novim terapijskim pristupima. Poslednje dve decenije, sa ubrzanim razvojem nanostrukturnih materijala i nanomedicine uopšte, donose revolucionarne napretke u medicini i farmaciji.

Superparamagnetne nanočestice (SMNČ) na bazi magnetita (Fe_3O_4) pokazale su značajnu prednost u odnosu na druge nanočestične materijale, zbog svojih povoljnih fizičko-hemijskih karakteristika, sposobnosti generisanja toplote kada se nađu u promenljivom magnetnom polju određene frekvencije, biokompatibilnosti i jednostavnog načina sinteze i funkcionalizacije. Više od jedne decenije, ove nanočestice su u upotrebi u terapiji određenih vrsta tumora magnetnom hipertermijom.

Osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je razvoj novih radiofarmaceutika na bazi obloženih SMNČ obeleženih radionuklidima ^{99m}Tc i ^{177}Lu za potencijalnu primenu u dijagnostici i terapiji karcinoma. Ovaj cilj je ostvaren kroz više pojedinačnih ciljeva koji su obuhvatali: sintezu stabilnih biokompatibilnih SMNČ i ispitivanje uslova za njihovo oblaganje biokompatibilnim jedinjenjima (MDP, HEDP i DMSA), fizičko-hemijsku karakterizaciju neobloženih i obloženih SMNČ, određivanje SAR vrednosti obloženih SMNČ, ispitivanje uslova obeležavanja obloženih SMNČ sa ^{99m}Tc i ^{177}Lu , ispitivanje biološke raspodele radioobeleženih SMNČ po organima eksperimentalnih životinja (na pacovima i miševima) i *in vivo* ispitivanje terapijske efikasnosti radioobeleženih SMNČ nakon njihove intratumorske primene u BALB/c miševima sa indukovanim ksenograftima CT-26 i 4T1 mišjeg karcinoma kolona i dojke.

Dobijeni rezultati pokazali su da se metodom koprecipitacije sintetišu SMNČ u dobrom prinosu ($\sim 65\%$ u odnosu na teorijski izračunatu masu), a dobijene čestice su sfernog oblika, ujednačene veličine (prečnika ~ 11 nm) i morfologije (PdI vrednost od 28,3%), što ovu metodu čini najboljom metodom sinteze ovih SMNČ. Metode fizičko-hemijske karakterizacije su potvrdile da su oblaganjem površine SMNČ sa MDP, HEDP i DMSA dobijene biokompatibilne i stabilne nanosuspencije, sa visokom vrednošću SAR parametra. Pod optimizovanim uslovima, dobijene su ^{99m}Tc i ^{177}Lu radioobeležene SMNČ u visokom prinosu ($>95\%$, odnosno $>70\%$), visoke radiohemijske čistoće i stabilne u humanom serumu i fiziološkom rastvoru na 37°C tokom ispitivanog vremenskog perioda. Rezultati ispitivanja biodistribucije tehnecijumom-99m obeleženih SMNČ nakon i.v. injekcije pacovima soja Wistar pokazali su da je najveći procenat nakupljanja u organima RES-a ($>90\%$). Rezultati biodistribucije ^{177}Lu -DMSA-SMNČ nakon i.t. injekcije BALB/c miševima sa indukovanim ksenograftima CT-26 i 4T1 tumora pokazali su da se radioobeležene čestice zadržavaju u tumorskom tkivu dovoljno dugo da zračenje može da izazove terapijski efekat. Terapijska efikasnost ^{177}Lu -DMSA-SMNČ je zavisila od injektovane doze zračenja, kao i od početne veličine ksenografta.

Dobijeni rezultati istraživanja pokazuju da intratumorska primena radioobeleženih nanočestica ima značajan potencijal u terapiji solidnih tumora, zahvaljujući postignutoj visokoj efikasnosti i dobrom bezbednosnom profilu.

Vezivanjem radionuklida za različite funkcionalne grupe na površini obloženih, biokompatibilnih SMNČ dobija se potencijalni multifunkcionalni dijagnostički, terapijski i teranostički agens.

Ključne reči: nanomedicina, superparamagnetne nanočestice, nuklearna medicina, teranostički agens, nanobrahiterapija, tehnecijum-99m, lutecijum-177, terapijska efikasnost

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija

Development of coated superparamagnetic nanoparticles labeled with ^{99m}Tc and ^{177}Lu and testing their efficacy in an experimental model of breast and colon carcinoma

Abstract

In view of the growing rate of malignant diseases in the world and the insufficient effectiveness of existing therapies, great efforts are being invested in the development of new generations of diagnostic and therapeutic medicines with a lower tendency to adverse effects. The lack of effective treatment strategies underlines the need for new therapeutic approaches. The last two decades have brought revolutionary advances in medicine and pharmacy with the accelerated development of nanostructured materials and nanomedicine in general.

Superparamagnetic nanoparticles based on magnetite (Fe_3O_4) (SPIONs) have shown a significant advantage over other nanoparticle materials, due to their favorable physical and chemical characteristics, the ability to generate heat when they are in a variable magnetic field of a certain frequency, biocompatibility and simple method of synthesis and functionalization. For more than a decade, these nanoparticles have been used in the therapy of certain types of tumors with magnetic hyperthermia.

The main goal of the research of this doctoral dissertation was the development of new radiopharmaceuticals based on coated SPIONs labeled with radionuclides ^{99m}Tc and ^{177}Lu for potential application in cancer diagnosis and therapy. This goal was achieved through a number of individual goals that included: synthesis of stable biocompatible SPIONs and examination of conditions for their coating with biocompatible compounds (MDP, HEDP and DMSA), physicochemical characterization of uncoated and coated SPIONs, determination of SAR values of coated SPIONs, examination of labeling conditions coated SPIONs with ^{99m}Tc and ^{177}Lu , examining the biological distribution of radiolabeled SPIONs in the organs of experimental animals (on rats and mice) and *in vivo* investigation of the therapeutic efficacy of radiolabeled SPIONs after their intratumoral administration in BALB/c mice with induced xenografts of CT-26 and 4T1 colon and murine mammary carcinomas.

Based on the obtained results, it is considered that the coprecipitation method has a great advantage because it enables the synthesis of SPIONs in a good yield ($\sim 65\%$ compared to the theoretically calculated mass), and spherical particles of uniform size (diameter ~ 11 nm) and morphology (PDI $\sim 28,3\%$). Physico-chemical characterization methods confirmed that biocompatible and stable nanosuspensions, with a high value of the SAR parameter, were obtained by coating the surface of SPIONs with MDP, HEDP and DMSA.

Under optimized conditions, ^{99m}Tc and ^{177}Lu radiolabeled SPIONs of high yield ($>95\%$ or $>70\%$) and high radiochemical purity, stable in human serum and saline at 37°C during the investigated time, were obtained. Results of the biodistribution study of technetium-99m labeled SPIONs after i.v. injections in Wistar rats showed that the highest percentage of accumulation was in the RES organs ($>90\%$). Results of biodistribution of ^{177}Lu -DMSA-SPIONs after i.t. injections into BALB/c mice with induced CT-26 and 4T1 tumor xenografts showed that the radiolabeled particles persisted in the tumor tissue long enough for the radiation to induce a therapeutic effect. The therapeutic efficacy of ^{177}Lu -DMSA-SPION depended on the injected dose of radiation, as well as on the initial size of the xenograft.

The obtained research results show that the intratumoral application of radiolabeled nanoparticles has a significant potential in the therapy of solid tumors, thanks to the achieved high efficiency and good safety profile.

By binding radionuclides to different functional groups on the surface of coated, biocompatible SPIONs, a potential multifunctional diagnostic, therapeutic and theranostic agent is obtained.

Keywords: nanomedicine, superparamagnetic nanoparticles, nuclear medicine, theranostic agent, nanobrachytherapy, technetium-99m, lutetium-177, therapeutic efficacy, pharmacokinetic profile

Scientific field: Pharmacy

Scientific discipline: Pharmacology

Zahvalnica

Na ovom mestu želim iskoristim priliku da izrazim svoju najiskreniju zahvalnost svima koji su doprineli nastanku moje doktorske disertacije.

Prvo, iz sveg srca želim da se zahvalim svojim mentorima dr Magdalenii Radović, višem naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča” i prof. dr Miroslavu Saviću, redovnom profesoru Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, za ogromnu podršku, pomoć i lepu saradnju, kao i za sve korisne savete koje su mi uputili prilikom pisanja doktorske teze.

Veliku zahvalnost dugujem i članovima komisije, dr Mariji Mirković, dr Zorani Milanović, višim naučnim saradnicima Instituta za nuklearne nauke „Vinča” i prof. dr Jasmini Brborić, vanrednom profesoru Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, čija su usmerenja, stručne sugestije, povratne informacije i konstruktivni komentari značajno doprineli kvalitetu ovog rada. Vaša podrška i stručnost bili su od neprocenjivog značaja za izradu ovog doktorata.

Posebnu zahvalnost dugujem mojoj dragoj kolegici dr Drini Janković, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča” na nesebičnom angažovanju, pruženim korisnim savetima, temeljnosti, posvećenosti i celokupnoj pomoći i podršci, kako tokom eksperimentalnog rada, tako i tokom pisanja same disertacije.

Zahvaljujem se dr Milici Mijović, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Prištini-Kosovskoj Mitrovici na nesebičnom prenošenju znanja u interpretaciji rezultata patohistoloških ispitivanja.

Dr Željku Prijoviću, višem naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča” želim da iskažem veliku zahvalnost za pomoć u realizaciji dela disertacije koji se odnosi na ispitivanja na laboratorijskim životinjama kao i praktične savete tokom pripreme i bojenja patohistoloških preparata i interpretacije dobijenih rezultata.

Zahvalila bih se i dr Penelopi Bouziotis, rukovodiocu Laboratorije za radiohemijska istraživanja Instituta „Demokritos” u Atini, na svom angažovanju i ostvarenoj saradnji koja predstavlja bitan deo ove disertacije.

Srdačno se zahvaljujem kolegama iz Laboratorije za teorijsku fiziku i fiziku kondenzovane materije, Instituta za nuklearne nauke „Vinča” na ostvarenoj saradnji u vezi sa fizičko-hemijskom karakterizacijom sintetisanih materijala.

Zahvaljujem se mojoj dragoj kolegici iz kancelarije, dr Oliveri Laban - Božić, na velikoj podršci i konstruktivnim savetima koje mi je pružala na ovom dugom i zahtevnom putu.

Zahvaljujem se dr Sanji Vranješ-Đurić, naučnom savetniku i rukovodiocu Laboratorije za radioizotope, Instituta za nuklearne nauke „Vinča” na neverovatnoj energiji, trudu i nesebičnoj pomoći na realizaciji ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se mnogo i svim ostalim kolegama u Laboratoriji za radioizotope, Instituta za nuklearne nauke „Vinča” na kolegijalnoj podršci i razumevanju.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici, suprugu Miroslavu i ćerkama Maši i Višnji za beskrajnu podršku, razumevanje i ljubav, bez kojih sve ovo ne bi imalo smisla. Srećna, zadovoljna i zahvalna što ste deo mog života.

I na kraju, ono što nikada ne bi trebali zaboraviti je neizmerna ljubav i podrška koju sam dobijala od roditelja tokom čitavog mog školovanja. Zato ovu doktorsku disertaciju, posvećujem njima. Hvala vam na svemu!

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Epidemiološka slika karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma	2
1.1.1. Karcinom dojke	2
1.1.2. Kolorektalni karcinom	3
1.1.3. Perspektive u lečenju karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma	3
1.2. Biološki efekti jonizujućeg zračenja	4
1.2.1. Direktno dejstvo jonizujućih zračenja na biološki sistem	5
1.2.2. Indirektno dejstvo jonizujućih zračenja na biološki system	6
1.2.3. Neciljani efekti jonizujućeg zračenja	7
1.3. Nuklearna medicina	10
1.3.1. Radiofarmaceutici u dijagnostici	10
1.3.1.1. Tehnecijum-99m (^{99m}Tc)	11
1.3.2. Radionuklidna terapija	12
1.3.2.1. Lutecijum-177 (^{177}Lu)	16
1.3.3. Teranostika - budućnost nuklearne medicine	16
1.4. Magnetne nanočestice – primena u medicini	18
1.4.1. Radioobeležavanje SMNČ	20
1.4.1.1. Metode obeležavanja SMNČ radionuklidima	21
1.4.2. Biološko ponašanje SMNČ	22
1.4.2.1. Terapijska efikasnost nanoformulacija nakon intravenske (i.v.) primene.	24
1.4.2.2. Terapijska efikasnost nanoformulacija nakon intratumorske (i.t) primene	26
1.4.2.2.1. Tumorsko mikrokruženje (TME)	29
1.4.2.2.2. Uticaj fizičko-hemijskih nanočestica	30
1.4.2.2.3. Tehnika injektovanja leka	31
2. CILJEVI I RADNE HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	32
2.1. Ciljevi istraživanja	33
2.2. Radne hipoteze istraživanja	33
3. EKSPERIMENTALNI DEO	34
3.1. Materijal.	35
3.2. Sinteza SMNČ na bazi Fe_3O_4	37
3.2.1. Sinteza SMNČ taloženjem iz rastvora (metoda koprecipitacije)	37
3.2.2. Sinteza SMNČ metodom koprecipitacije uz završni kiselinski tretman prečišćavanja	37
3.2.3. Sinteza SMNČ metodom koprecipitacije uz primenu mikrotalasnog tretmana	37
3.3. Postupak funkcionalizacije sintetisanih SMNČ	38

3.3.1. Oblaganje SMNČ bisfosfonatima HEDP i MDP	38
3.3.2. Oblaganje SMNČ sa DMSA.....	38
3.4. Metode fizičko-hemijske karakterizacije sintetisanih SMNČ	38
3.4.1. Elektronska mikroskopija	38
3.4.2. Rendgenska difrakcija na prahu	39
3.4.3. Dinamičko rasejanje svetlosti i zeta potencijal	39
3.4.4. Furijeova transformaciona infracrvena spektroskopija	40
3.4.5. Magnetna merenja	40
3.4.6. Određivanje specifične brzine apsorpcije (SAR).....	40
3.5. Radioobeležavanje.....	40
3.5.1. Optimizacija obeležavanja obloženih SMNČ tehnecijumom-99m	40
3.5.2. Optimizacija obeležavanja obloženih SMNČ lutecijumom-177	41
3.5.3. Određivanje radiohemijske čistoće radioobeleženih SMNČ	41
3.5.3.1. Određivanje radiohemijske čistoće ^{99m}Tc -SMNČ	41
3.5.3.2. Određivanje radiohemijske čistoće ^{177}Lu -SMNČ	42
3.5.4. Određivanje in vitro stabilnosti ^{99m}Tc -SMNČ i ^{177}Lu -SMNČ	42
3.6. Eksperimentalne životinje.....	43
3.6.1. Wistar beli pacovi	43
3.6.2. BALB/c miševi	43
3.7. Čelijske linije.....	43
3.7.1. Gajenje kulture ćelija	44
3.7.2. Brojanje ćelija.....	45
3.7.3. Tumorski ksenografti.....	45
3.8. Farmakokinetički profil radioobeleženih SMNČ	46
3.8.1. Biološka raspodela ^{99m}Tc -SMNČ u pacovima soja Wistar	46
3.8.2. Scintigrafske studije.....	46
3.8.3. Biološka raspodela ^{177}Lu -DMSA-SMNČ.....	46
3.8.4. Terapijska efikasnost ^{177}Lu -DMSA-SMNČ	47
3.8.4.1. Uticaj različitih doza zračenja na terapijsku efikasnost ^{177}Lu -DMSA-SMNČ.....	47
3.8.4.2. Ispitivanje toksičnosti ^{177}Lu -DMSA-SMNČ.....	47
3.8.4.3. Uticaj početne veličine ksenografta na efikasnost terapije ^{177}Lu -DMSA-SMNČ	48
3.9. Patohistološka analiza	48
3.10. Statistička obrada rezultata	49
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	50
4.1. Sinteza i karakterizacija SMNČ na bazi Fe_3O_4	51
4.1.1. Sinteza Fe_3O_4 SMNČ metodom koprecipitacije	51
4.1.2. Karakterizacija dobijenih SMNČ na bazi Fe_3O_4	52
4.1.2.1. Karakterizacija metodom XRPD	52
4.1.2.2. Karakterizacija metodom transmisione elektronske mikroskopije	53
4.2. Funkcionalizacija SMNČ	55

4.3. Karakterizacija obloženih SMNČ	57
4.3.1. Karakterizacija SMNČ obloženih bisfosfonatima (MDP i HEDP)	57
4.3.1.1. Karakterizacija MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ metodom XRPD	57
4.3.1.2. Karakterizacija MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ metodom DLS	57
4.3.1.3. Određivanje zeta potencijala MDP-SMNČ i HEDP-SMN	58
4.3.1.4. Karakterizacija MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ metodom FTIR	58
4.3.1.5. Magnetna svojstva MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ	60
4.3.1.6. Magnetna hipertermija MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ	61
4.3.2. Karakterizacija SMNČ obloženih sa DMSA	63
4.3.2.1. Karakterizacija DMSA-SMNČ metodom XRPD	63
4.3.2.2. Karakterizacija DMSA-SMNČ metodom DLS	63
4.3.2.3. Određivanje zeta potencijala DMSA-SMNČ	63
4.3.2.4. Karakterizacija DMSA-SMNČ metodom FTIR	64
4.3.2.5. Magnetna svojstva DMSA-SMNČ	65
4.3.2.6. Magnetna hipertermija DMSA-SMNČ	66
4.4. Radioobeležavanje obloženih SMNČ	66
4.4.1. Radioobeležavanje obloženih SMNČ tehnećijumom- ^{99m} Tc	66
4.4.1.1. Studije in vitro stabilnosti obloženih SMNČ obeđenih sa ^{99m} Tc	68
4.4.1.2. Studije ex vivo biodistribucije obloženih SMNČ obeđenih sa ^{99m} Tc	69
4.4.1.3. Scintigrafske studije sa ^{99m} Tc–HEDP-SMNČ	71
4.4.2. Radioobeležavanje obloženih SMNČ lutecijumom- ¹⁷⁷ Lu	72
4.4.2.1. In vitro stabilnost ¹⁷⁷ Lu-DMSA-SMNČ	72
4.4.2.2. Ispitivanje biološke raspodele ¹⁷⁷ Lu-DMSA-SMNČ	73
4.4.2.2.1. Ispitivanje biološke raspodele ¹⁷⁷ Lu-DMSA-SMNČ nakon i.v. injekcije	73
4.4.2.2.2. Ispitivanje biološke raspodele ¹⁷⁷ Lu-DMSA-SMNČ nakon i.t. injekcije	75
4.5. Terapijska efikasnost ¹⁷⁷ Lu-DMSA-SMNČ	78
4.5.1. Uticaj različitih doza zračenja na terapijsku efikasnost ¹⁷⁷ Lu-DMSA-SMNČ	79
4.5.2. Ispitivanje toksičnosti ¹⁷⁷ Lu-DMSA-SMNČ	82
4.5.3. Uticaj veličine ksenografta na efikasnost terapije ¹⁷⁷ Lu-DMSA-SMNČ	83
4.6. PATOHISTOLOŠKA ANALIZA	86
5. ZAKLJUČAK	93
6. LITERATURA	97

LISTA SKRAĆENICA

AE	apскопni efekat (engl. <i>abscopal effect</i>)
API	aktivna farmaceutska supstanca (engl. <i>active pharmaceutical ingredient</i>)
BE	bajstender efekat (engl. <i>bystander effect</i>)
BSA	goveđi serum albumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CAF	fibroblasti povezani sa tumorima (engl. <i>cancer-associated fibroblast</i>)
CE	kohortni efekat (engl. <i>cohort effect</i>)
CF	efekat „unakrsne vatre” (engl. <i>“cross-fire” effect</i>)
CEA	karcinoembrionski antigen (engl. <i>carcino embrionic antigen</i>)
CNS	centralni nervni sistem
COX-2	ciklooksigenaza-2
CT	kompjuterska tomografija (engl. <i>computed tomography</i>)
DLS	dinamičko rasejanje svetlosti (engl. <i>dynamic light scattering</i>)
DMSA	mezo-2,3-dimerkaptoćilibarna kiselina (engl. <i>dimercaptosuccinic acid</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DOKS	doksorubicin
DOTA	1,4,7,10 tetrazociklododekantetrasirćetna kiselina (engl. 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)
DTPA	dietilentriamino pentasirćetna kiselina (engl. diethylenetriaminepentaacetic acid)
EMA	Evropska agencija za lekove (engl. <i>European Medicines Agency</i>)
EPR	efekat povećane propustljivosti i zadržavanja (engl. <i>enhanced permeability and retention</i>)
EU	Evropska unija (eng. <i>European union</i>)
FDA	Američka agencija za hranu i lekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FTIR	I Infračrvena spektroskopija Furijeove transformacije (engl. <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
HE	hematoksilin/eozin
HEDP	etidronska kiselina (1-hidroksietan-1,1-bisfosfonat)
HER	receptor za humani epidermalni faktor 2 (engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HSA	humani serum albumin

HT	hipertermija
IARC	Međunarodna agencija za istraživanja kancera (engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IFP	intersticijalni pritisak tečnosti (engl. <i>interstitial fluid pressure</i>)
i.t.	intratumorski
i.v.	intravenski
IL-8	interleukin-8
IL-10	interleukin-10
IL-6	interleukin-6
iNOS	inducibilna azot-monoksid sintaza (engl. <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
ID	injektovana doza
ITLC	instant hromatografija na tankom sloju (engl. <i>instant thin layer chromatography</i>)
LD ₅₀	srednja smrtonosna doza supstance ili količina supstance koja je potrebna za letalan ishod kod 50% date populacije ispitanika (engl. <i>median lethal dose</i>)
LET	linearni transfer energije (engl. <i>linear energy transfer</i>)
LOX	lizil oksidaza (engl. <i>lysyl oxidase</i>)
MAPKs	mitogenom-aktivirane proteinske kinaze
MDP	medronska kiselina (metilen-bisfosfonat)
MFBG	m-fluorobenzilgvanidin (engl. <i>meta-fluorobenzylguanidine</i>)
MIBG	m-jod benzilgvanidin (engl. <i>meta-iodobenzylguanidine</i>)
MNČ	magnetne nanočestice
MHT	magnetna hipertermija
MRI	magnetna rezonanca (engl. <i>magnetic resonance imaging</i>)
M _s	magnetna saturacija
NET	neuroendokrini tumor (engl. <i>neuroendocrine tumor</i>)
NBT	nanobrahiterapija (engl. <i>nanobrachytherapy</i>)
NFκB	nuklearni faktor kapa B
PG E2	prostaglandin E2
PG I2	prostaglandin I2
Pdi	indeks polidisperznosti (engl. <i>polydispersity index</i>)
PBS	fiziološki rastvor puferovan fosfatom (engl. <i>phosphate saline buffer</i>)

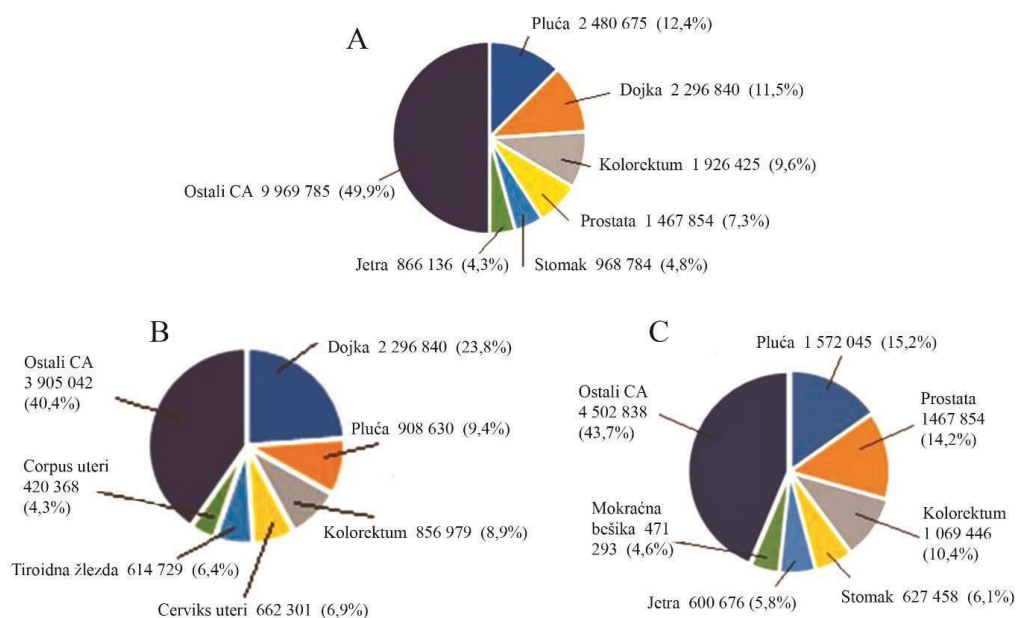
PEO	polietilen oksid
PEG	polietilen glikol
PET	pozitronska emisiona tomografija (engl. <i>Positron emission tomography</i>)
PVP	polivinilpirolidon
PVA	polivinilalkohol
PP	prusko plavo (engl. prussian blue)
PKC	protein kinaza C (engl. protein kinase C)
PSMA	prostata specifični membranski antigen (engl. <i>prostate-specific membrane antigen</i>)
PDGF	trombocitni faktor rasta (engl. <i>platelet-derived growth factor</i>)
RCP	radiohemijska čistoća (engl. <i>radiochemical purity</i>)
RES	retikuloendotelni sistem
RIBE	zračenjem indukovani bajstender efekat (engl. <i>radiation induced bystander effect</i>)
RNK	ribonukleinska kiselina
ROS	reaktivne kiseonične vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RPMI-1640 medijum	medijum za kultivaciju tumorskih ćelijskih kultura (engl. <i>Roswell park memorial institute medium</i>)
RT	radionuklidna terapija
RNS	reaktivni azotni radikali (engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
SAD	Sjedinjene Američke Države
SAR	specifična brzina apsorpcije (engl. specific absorption rate)
s.c.	subkutano
SD	standardna devijacija
SMNČ	superparamagnetne nanočestice
SMP	spoljašnje magnetno polje
SPECT	jednofotonska emisiona kompjuterizovana tomografija (engl. <i>single photon emission computed tomography</i>)
SSTRs	receptori za somatostatin (engl. <i>somatostatin receptors</i>)
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
TAM	makrofagi povezani sa tumorom (engl. <i>tumor associated macrophages</i>)
TEM	transmisiona elektronska mikroskopija (engl. <i>transmission electron microscopy</i>)
TGF β -1	transformišući faktor rasta tumora 1- β (engl. <i>transforming growth factor β</i>)

TME	tumorsko mikrokruženje (engl. <i>tumor microenvironment</i>)
TNF α	faktor nekroze tumora α
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
XRPD	difrakcija X-zraka na prahu (engl. <i>X-ray powder diffraction</i>)
UNSCEAR	Komitet Ujedinjenih nacija za efekte zračenja (engl. <i>United Nations Committee on the Effects of Atomic Radiation</i>)
4T1	komercijalna linija mišjeg karcinoma dojke
CT-26	komercijalna linija mišjeg karcinoma kolona

1. UVOD

1.1 Epidemiološka slika karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma

Protekle dve decenije, svedoci smo globalnog trenda porasta stope oboljevanja i mortaliteta od brojnih neinfektivnih bolesti, među kojima posebno mesto imaju maligne bolesti. Prema procenama Međunarodne agencije za istraživanje kancera (IARC) i Svetske zdravstvene organizacije (SZO) u 2020. godini od malignih bolesti u svetu je obolelo 19,3 miliona ljudi, dok je registrovano preko 10 miliona smrtnih slučajeva (1). Trenutne procene ukazuju da u svetu ima preko 30 miliona ljudi kojima je u poslednjih pet godina dijagnostikovano neko maligno oboljenje, a koji su ili završili lečenje ili su i dalje pod nekom vrstom terapije (2). Najviše zabrinjava podatak da stopa oboljevanja raste iz godine u godinu (3). Predviđa se da će do 2040. godine broj novoobolelih onkoloških bolesnika premašiti 27,5 miliona godišnje i da će broj smrtnih slučajeva prevazići srčana oboljenja. (4). Prema podacima IARC-a za 2021. godinu (slika 1), karcinomi pluća, dojke, debelog creva i prostate obuhvataju preko 40% svih malignih oboljenja.



Slika 1. Vodeće lokalizacije u oboljevanju od malignih tumora u svetu u 2023. godini, kod: **A)** oba pola, **B)** žena i **C)** muškaraca. (Preuzeto iz GCO, IARC, pristup 12.2024)

U Republici Srbiji su stopa oboljevanja od malignih bolesti kao i broj slučajeva otkrivenih u uznapredovalim stadijumima bolesti jako visoki. Statistički podaci iz 2021. godine pokazuju da je u Republici Srbiji registrovan 41 784 novi slučaj oboljevanja od svih oblika karcinoma, dok je broj preminulih iznosio 19 979 (5). Muškarci u Srbiji najčešće su oboljevali od karcinoma pluća i bronha, dok je karcinom kolona i rektuma bio na drugom mestu po zastupljenosti. Žene su najčešće obolele od karcinoma dojke, a na trećem mestu po učestalosti je bio karcinom kolona i rektuma.

1.1.1. Karcinom dojke

Karcinom dojke je jedan od najčešćih oblika maligniteta kod žena. Incidenca ove bolesti kontinuirano raste na globalnom nivou. Starosna granica u kojoj se ova bolest javlja

pomera se sa 50-70 godina na 30-40 godina (6). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, u 2020. godini je registrovano oko 2,3 miliona novih slučajeva karcinoma dojke i preko 685 000 smrtnih ishoda. Iste godine, Međunarodna agencija za istraživanje kancera (IARC) objavila je na svom zvaničnom sajtu da je karcinom dojke zvanično zamenio karcinom pluća prema broju obolelih i tako postao najčešće dijagnostifikovani karcinom na svetu (7).

U našoj zemlji, poslednjih decenija raste broj novoobolelih od karcinoma dojke, ali i broj umrlih. Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, u 2020. godini, karcinom dojke je bio najčešći tip karcinoma kod žena u Srbiji, sa oko 4 600 novih slučajeva, dok je oko 1 700 preminulo. Republika Srbija se nalazi na drugom mestu po mortalitetu od ove bolesti u Evropi. Zastupljenost novootkrivenih slučajeva u ranoj fazi bolesti u našoj zemlji je oko 30%. Kod preostale dve trećine žena, bolest je regionalno proširena, dok 10% žena ima i udaljene metastaze.

1.1.2. Kolorektalni karcinom

Kolorektalni karcinom je jedan od najčešćih karcinoma u savremenom dobu. Prema podacima SZO, ovaj karcinom je treći najčešći maligni tumor kod muškaraca i drugi kod žena, sa oko 1,8 miliona novih slučajeva i 881 000 smrtnih ishoda u 2018. godini, što čini oko 9,8% svih malignih bolesti. Muškarci oboljevaju 1,1–1,6 puta češće od žena (10).

Prema podacima “Globocan”-a, kolorektalni karcinom je u Srbiji drugi najčešći uzrok oboljevanja kod žena (iza karcinoma dojke) i muškaraca (iza karcinoma pluća), sa preko 4 500 novootkrivenih slučajeva godišnje. Standardizovana stopa incidence za ovaj karcinom u Srbiji iznosi 27,0 na 100 000 stanovnika (33,6 za muškarce i 20,9 za žene) (10). Stopa incidence raste sa godinama starosti kod oba pola (11). Zabrinjavajuće je što se u Srbiji primećuje porast broja obolelih među osobama mlađim od 40 godina, što je trend sličan ostalim zemljama istočne Evrope (12).

Što se tiče mortaliteta, kolorektalni karcinom je drugi vodeći uzrok smrti kod muškaraca (iza karcinoma pluća) i treći kod žena (iza karcinoma dojke i grlića materice), sa preko 2000 smrtnih ishoda godišnje. Standardizovana stopa mortaliteta za kolorektalni karcinom u Srbiji iznosi 16,6 na 100 000 stanovnika (21,1 za muškarce i 12,9 za žene). Otkrivanje kolorektalnog karcinoma u ranim stadijumima (prvi i drugi od ukupno četiri) omogućava visoku stopu izlečenja, obično između 90% i 100%.

1.1.3. Perspektive u lečenju karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma

S obzirom na svoju različitu etiologiju i veliku heterogenost, prevencija i terapija karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma predstavljaju pravi izazov savremenog doba i zahtevaju jedan multidisciplinarni pristup. Cilj terapije može biti različit: izlečenje, produženje života ili samo poboljšanje kvaliteta života pacijenata. Izbor terapije zavisi od mnogih faktora, među kojima su vrsta i stadijum bolesti, životna dob i opšte zdravstveno stanje pacijenta (druge akutne i hronične bolesti od kojih pacijent boluje i terapije koje prima). Trenutno, metode lečenja karcinoma dojke i kolorektuma uključuju hirurški tretman, hemioterapiju, radioterapiju, imunoterapiju, hormonsku terapiju i neke druge (7). I pored tako velikih mogućnosti različitih vidova lečenja, situacija je takva da je i dalje prisutan visok procenat smrtnosti od malignih bolesti, a korišćeni agensi usled nedostatka specifičnosti, ispoljavaju veliki broj neželjenih reakcija koje narušavaju kvalitet života obolelih osoba i dovode do sekundarnih komplikacija (13). Hemioterapija, kao jedna od

najčešće korišćenih metoda lečenja karcinoma, ispoljava značajne nedostatke među kojima se kao glavni ističe niska selektivnost vezivanja za ciljna mesta, što za posledicu ima ispoljavanje visoke toksičnosti po zdrave ćelije (6). Nedostatak efikasnih metoda lečenja naglašava potrebu za novim terapijskim pristupima. Inovativne terapije su neophodne, posebno za pacijente sa rezistentnim oblicima karcinoma, kao što su trostruko negativni karcinom dojke ili metastatski karcinom dojke i kolona. Zahvaljujući brzom razvoju nauke i medicine proteklih nekoliko decenija, danas se, sa više ili manje uspeha, uvodi veći broj novih, veoma različitih terapijskih pristupa (14) Neki od njih su odobreni od strane relevantnih regulatornih tela, dok se drugi nalaze u različitim fazama ispitivanja. Velike nade polažu se i u brojne ohrabrujuće pretkliničke i kliničke rezultate dobijene na polju nanomedicine i nuklearne medicine.

1.2. Biološki efekti jonizujućeg zračenja

Jonizujuća zračenja su zračenja koja imaju dovoljno visoku energiju da mogu da dovedu do jonizacije materije kroz koju prolaze. U jonizujuća zračenja spadaju: elektromagnetno zračenje (X-zračenje i γ -zračenje) i čestično zračenje (elektroni, pozitroni, protoni, neutron, deuteroni, α -čestice, itd.).

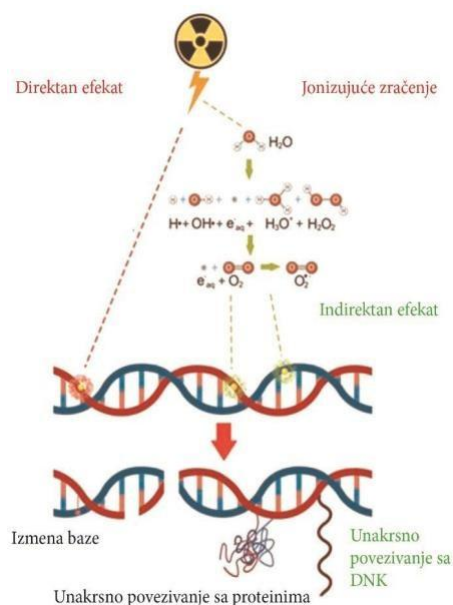
Pri prolasku zračenja kroz materiju dolazi do uzajamnog dejstva kroz fizičke efekte (jonizacije i ekscitacije atoma sredine), hemijske efekte (radijaciono – hemijske reakcije) i biološke efekte (koji proizilaze iz niza fizičkih i hemijskih reakcija, koje su izazvane primarnom jonizacijom tkiva, kroz koje zračenje prolazi). Istovremeno, sama materija slabi primarni snop zračenja i menja njegove osnovne karakteristike (15,16). U zavisnosti od vrste jonizujućeg zračenja kao i sredine kroz koju prolazi, raspored i udaljenost jonizovanih i ekscitovanih molekula i atoma će biti različit, pa će samim tim i linearni energetske transfer, koji predstavlja predaju energije upadnog zračenja po dužini pređenog puta ($-\Delta E/\Delta x$), biti različit. Takođe, od vrste i energije jonizujućeg zračenja zavisi i specifična jonizacija, odnosno ukupan broj jona koje jonizujuće zračenje proizvede u nekoj sredini po jedinici pređenog puta.

Prolaz alfa čestice kroz materiju određen je njenom relativno velikom kinetičkom energijom i masom. Velika razlika u masi između elektrona i alfa čestice ima za posledicu da pri interakciji sa pojedinačnim elektronom iz atomskog omotača atoma materije alfa čestica gubi mali deo kinetičke energije i ne skreće, već zadržava svoj prvobitni pravac. Na kraju, usled sudara sa jezgrom ili elektronom iz atomskog omotača atoma materije, alfa čestica gubi svu svoju energiju. Prolaz elektrona (beta čestica) kroz materiju je složeniji od prolaza alfa čestice zbog izrazito male mase i veće brzine. Zbog svoje male mase, beta čestice u elastičnim sudarima sa atomskim jezgrima i elektronima u omotaču jako skreću od prvobitne putanje, pa im je trag u vidu izlomljene linije. Kinetička energija beta čestica iz primarnog snopa opada posle svakog sudara. Takođe za razliku od naelektrisanih čestica, koje pri prolazu kroz materiju gube energiju uniformno i kontinualno, predaja energije X i gama-zračenja je slučajan proces. Svi primarni fotoni ne moraju da reaguju sa atomima i molekulima sredine.

Kao posledica interakcije zračenja sa materijom, jonizujuće zračenje gubi energiju, dok se materija menja fizički i hemijski, a kada je u pitanju živa materija i biološki. Biološki sistemi su vrlo osetljivi na zračenje. Jonizujuće zračenje deluje na tkiva i organe na ćelijskom nivou kidanjem hemijskih veza i menjanjem strukture molekula. Nakon ozračivanja, ćelija može da prođe bez posledica (- sačuvana reproduktivna sposobnost), da reparira svoja nastala oštećenja (kada oštećenje ozračene ćelije nema efekta na

organizam), mutira (uticaj na genetsko kodiranje ili DNK) ili podlegne ćelijskoj smrti (letalne ozlede, gubitak reproduktivne sposobnosti). Kakve će posledice jonizujuće zračenje ostaviti na biološki sistem, zavisi od velikog broja faktora, kao što su vrsta jonizujućeg zračenja, jačina doze, ukupna primljena doza, energija zračenja, površina tela izložena zračenju, radiosenzitivnost ćelije, individualna radiosenzitivnost, starost organizma, stanje imenskog sistema i sistema reparacije. Takođe, krajnji efekti zračenja zavise i od toga da li je doza data odjednom ili je frakcionisana odn. data u više vremenski razdvojenih ciklusa (17).

Dejstvo jonizujućeg zračenja na biološki sistem može biti direktno i indirektno (slika 2).



Slika 2. Efekat direktnog i indirektnog dejstva jonizujućih zračenja na DNK molekul. Prilagođeno prema (18)

1.2.1. Direktno dejstvo jonizujućih zračenja na biološki sistem

Direktno dejstvo zračenja na neki biološki sistem se može razmatrati pomoću klasične teorije mete (engl. Targeted theory) koja podrazumeva neposrednu interakciju zračenja sa određenim (kritičnim) molekulima u ćeliji, što dovodi do raskidanja hemijskih veza i narušavanja molekularne strukture ciljnog molekula (19). Kod ćelijskih struktura koje bivaju izložene zračenju, stepen oštećenja direktno je proporcionalan apsorbovanoj dozi zračenja i relativnom biološkom efektu različitih vrsta jonizujućih zračenja (20). Prolaskom kroz ćeliju, zračenje može intereagovati sa gotovo svim biomolekulima (DNK, proteinima, lipidima, ugljenim hidratima, fosfolipidima ćelijske membrane i dr), indukujući njihovu jonizaciju i ekscitaciju, što dalje dovodi do prekida postojećih hemijskih veza između molekula i formiranja novih veza između molekula i lanaca molekula (polimerizacija). Kao posledica oštećenja ćelijskih makromolekula, javljaju se poremećaji u metabolizmu i fiziološkim funkcijama, mutacije i na kraju potencijalno može doći do smrti ćelije.

Najvažniji makromolekul u ćeliji koji je odgovoran za razvoj i pravilno funkcionisanje svih živih organizama je DNK. Jonizujuće zračenje indukuje brojne vidove oštećenja DNK, poput delecija baznih parova, jednolančanih ili dvolančanih prekida. Dvolančani prekidi DNK nastaju pod dejstvom jonizujućih zračenja visokog LET-a (alfa zračenje, joni, neutron) ili velikih doza zračenja niskog LET-a i teže se mogu reparirati. Manja doza zračenja niskog LET-a (X, gama, β) uglavnom dovodi do jednolančanih prekida DNK (21,22). Dok se većina

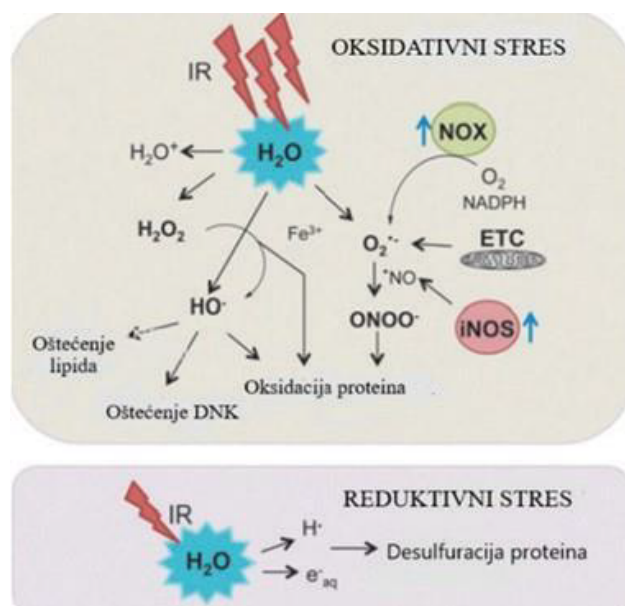
jednolančanih prekida lako popravlja, ispravljanje dvolančanih prekida je mnogo kompleksniji proces, jer uprkos visoko efikasnim sistemima reparacije, tačnost u ponovnom povezivanju fragmenata DNK nije uvek potpuna zbog čega može da dođe do preraspodele segmenata između hromozoma ili unakrsnog povezivanja molekula DNK sa proteinima (23). Ako se dvolančani prekidi zadrže do mitoze, tokom anafaze se mogu izgubiti fragmenti hromatida, što dovodi do pojave nebalansiranog genoma. Dvlančani prekidi i naročito višestruka, kompleksna oštećenja DNK za ćeliju su najčešće smrtonosni događaji (24).

Osim na DNK, jonizujuće zračenje deluje i na ostale ćelijske makromolekule. Radijaciono-hemijska oštećenja proteina mogu rezultirati poremećajem njihovih ključnih funkcija, uključujući enzimske, receptorske i hormonske. Enzimi su najmanje pogodni ciljani molekuli proteina za efikasno dejstvo zračenja zbog njihovog velikog broja i mogućnosti brze zamene u ćeliji, kao i visokih doza zračenja (preko 1 Gy) neophodnih za njihovu inaktivaciju. Efekat zračenja na ugljene hidrate zavisi od doze zračenja i svodi se na razgradnju ugljenih hidrata na njihove sastavne delove (25).

1.2.2. Indirektno dejstvo jonizujućih zračenja na biološki sistem

Proces oštećenja organizma pod uticajem zračenja je daleko složeniji nego što se može objasniti samo pomoću klasične “teorije mete” (19,26). Drugu grupu dejstava jonizujućeg zračenja čini njihovo indirektno dejstvo na biološki sistem (slika 3.) Kako voda čini 60-80% građe ćelije živih organizama, prilikom izlaganja jonizujućem zračenju, dolazi do radiolize vode i formiranja visokoreaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS): hidratizani, „akvatizovani” elektron (e^-), vodonični ($H^\cdot$), hidroksil radikal ($OH^\cdot$). Nastale reaktivne kiseonične vrste se mogu rekombinovati među sobom, pri čemu se formira toksični vodonik peroksid, H_2O_2 , dok u prisustvu kiseonika nastaju i superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) kao i hidroperoksi radikal ($HO_2^\cdot$). Ovo su izuzetno citotoksične vrste, koje u biološkim sistemima dovode do oštećenja ćelijske membrane, ćelijskih organela, citoplazme i oštećenja DNK, što dalje za posledicu može imati i ćelijsku smrt. Utvrđeno je da povećana koncentracija kiseonika pojačava dejstvo jonizujućih zračenja na biološke sisteme (27).

Količina reaktivnih vrsta nastalih pod uticajem jonizujućeg zračenja direktno je proporcionalna ukupnoj primenjenoj dozi zračenja (27).



Slika 3. Indirektni efekti jonizujućih zračenja. Prilagođeno prema (28)

1.2.3. Neciljani efekti jonizujućeg zračenja

Decenijama prisutna dogma u radijacionoj biologiji da su biološki efekti zračenja prisutni samo u ćelijama koje su direktno pogođene zračenjem, dovedena je u pitanje kada su brojna istraživanja u poslednje tri decenije ukazala da do određenih bioloških promena dolazi i u ćelijama koje nisu direktno pogođene jonizujućim zračenjem, pri čemu su posledice dejstva zračenja na njih bile mnogo dalekosežnije nego što se prvobitno smatralo (29).

Posmatranjem promena u neozračenim ćelijama, bilo onih u neposrednoj blizini ozračenih ili sasvim udaljenih, klasična radiobiološka teorija, značajno je poljuljana 1992. godine kada je Nagasawa na osnovu rezultata svojih eksperimenata došao do zaključka da ćelije ozračene jonizujućim zračenjem šalju signale različite prirode kojima deluju na neozračene ćelije (30,31). Tako su oštećenja DNK molekula u formi hromozomskih aberacija uočena ne samo u ćelijama direktno pogođenim zračenjem, već i u susednim, neozračenim ćelijama (32). Primećeno je da je oko 1% ćelija ozračenih α -zračenjem indukovalo nastanak promena na genetskom materijalu u oko 30% ukupno prisutnih ćelija u ispitivanom sistemu (33). Do istog zaključka došao je i Belyakov u svojim istraživanjima. Belyakov i saradnici dokazali su da je nastali efekat nakon ozračivanja tumorskog tkiva α -zračenjem znatno veći nego što je domet ovog tipa zračenja u tkivu i da je u tom slučaju iznosio oko 1 mm od ozračene zone (34). Uočeni efekti potvrđeni su u velikom broju *in vitro* i *in vivo* studija (29,33).

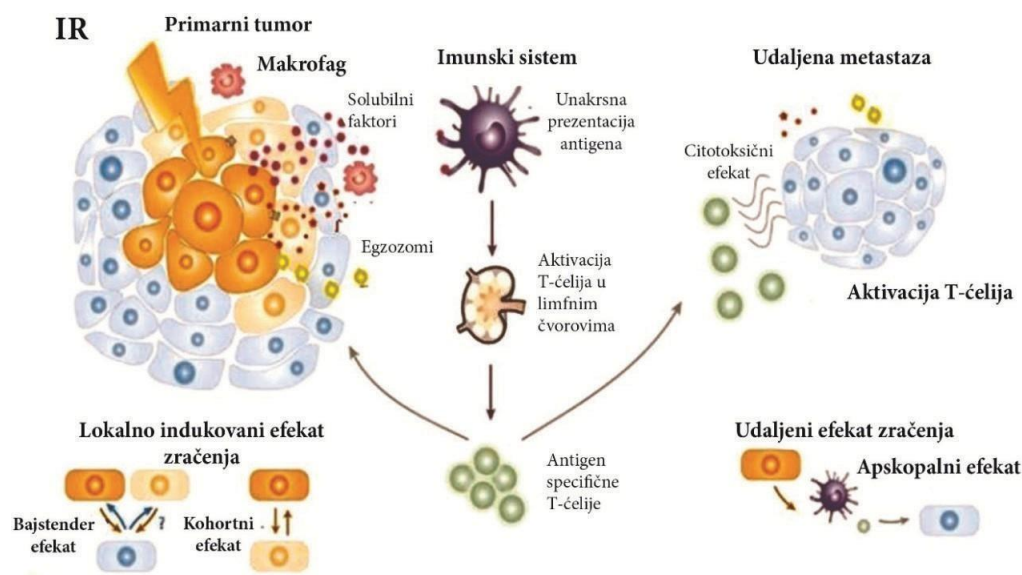
Prema autorima Blyth i Sykes, osim direktnih i indirektnih efekata jonizujućeg zračenja postoje i 3 grupe netargetiranih (neciljanih) efekata koji se dešavaju *in vivo*, a koji zavise od komunikacije između ozračenih i neozračenih ćelija (35). To su:

- a) bajstender efekat, BE (engl. *Bystander effect*),
- b) kohortni efekat, CE (engl. *Cohort effect*) i
- c) apskopalni efekat, AE (engl. *Abscopal effect*).

Komitet Ujedinjenih nacija za efekte zračenja definiše BE kao radiobiološki fenomen koji podrazumeva prenos različitih vrsta signala sa ozračenih na neozračene ćelije, prisutne u njihovom okruženju, uzrokujući na ovaj način u njima brojne biološke promene različitog ishoda. Drugim rečima, u ćelijama koje nisu izložene dejstvu zračenja se javljaju različite posledice usled prijema signala koji potiču od obližnjih ćelija, direktno izloženih zračenju. Kao odgovor na primljene signale kod neozračenih ćelija se mogu javiti promene u procesu translacije, genske ekspresije, ćelijske proliferacije, kao i ćelijska smrt. Smatra se da su ključni faktori odgovorni za BE: slobodni radikali, faktori imunskog sistema (citokini), promena ekspresije gena uključenih u inflamatorne puteve i epigenetički faktori.

Zračenjem indukovani AE (od latinske reči *ab scopus*, što znači udaljen od mete) je radiobiološki fenomen kod koga tokom terapije primarnog tumora jonizujućim zračenjem dolazi i do smanjenja netretirane metastatske lezije. Drugim rečima, nakon ozračenja primarnog tumora i izazivanja smrti njegovih ćelija, dolazi do izlaganja njihovog intracelularnog sadržaja ćelijama imunskog sistema organizma. Imunski odgovor uključuje regrutovanje citotoksičnih T-limfocita, koji potom identifikuju tumorske antigene, a zatim uništavaju udaljene tumorske ćelije, koje nisu bile direktno izložene zračenju (36). Sa kliničke tačke gledišta, ovo je najznačajniji neciljani efekat zračenja (35). Iako ne postoji jasna granica između BE i AE, BE se smatra lokalnim komunikacijskim efektom u radijusu od nekoliko ćelijskih dijametara, koji se odvija kroz sekreciju solubilnih faktora (signala) kroz interćelijske prostore ili uključivanjem inflamatornih ćelija tumorskog mikrookruženja (TME). Nasuprot tome, AE je sistemski efekat na udaljene metastaze (čak i desetinama centimetara udaljen od primarnog mesta ozračivanja), pretežno uzrokovan imunskim odgovorom organizma domaćina (30).

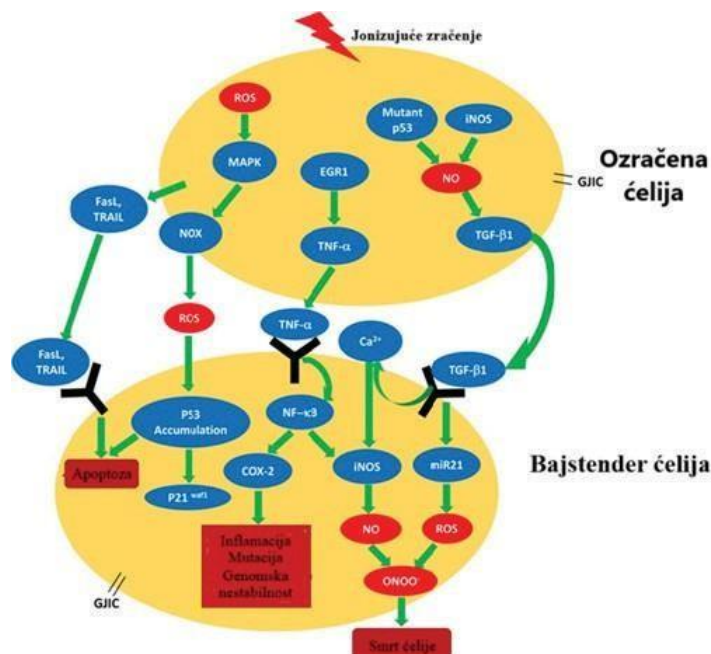
Treći, najmanje izučavan efekat je CE. Javlja kao posledica međusobne interakcije između ćelija unutar tumora nakon izlaganja zračenju. Ovaj efekat ograničen je na prostor od svega nekoliko milimetara. Dokazano je da tokom izlaganja tumora zračenju, sve njegove ozračene ćelije ne primaju istu dozu zračenja (30). Ozračene ćelije komuniciraju sa svojim susedima putem parakrinih i autokrinih signalnih puteva. Parakrini signalni putevi omogućavaju ćelijama koje su primile veću dozu zračenja da šalju signale drugim ćelijama u njihovoj blizini, koje su primile manju dozu i obrnuto. Autokrini signalni putevi omogućavaju ćelijama da reaguju na signale koje same oslobađaju. To znači da ozračene ćelije mogu delovati na sebe same putem ovih signalnih puteva (35). Ovaj efekat zavisi od ukupne primljene doze i vrste jonizujućeg zračenja, kao i od bioloških karakteristika tumora. Ukratko, međusobne interakcije između ozračenih ćelija kod tumora su važan aspekt radioterapije i radionuklidne terapije i mogu imati različite efekte na tumorski rast i njegovo širenje. Kako je CE najmanje izučavan neciljani efekat jonizujućeg zračenja, on se vrlo često svrstava pod BE (slika 4) (37).



Slika 4. Neciljani efekti jonizujućeg zračenja. Prilagođeno prema (30)

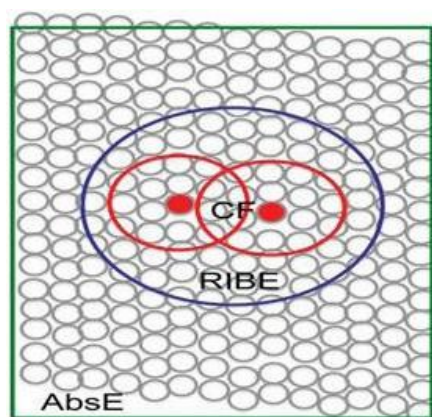
U solubilne signalne faktore, zaslužne za neciljane efekte jonizujućeg zračenja ubrajaju se: faktor rasta tumora 1 beta ($TGF\ \beta-1$), faktor nekroze tumora α ($TNF\ \alpha$), brojni interleukini (IL-2, IL-6, IL-8 itd.). U ostale, ali ne i manje važne mehanizme, zaslužne za nastanak krajnjeg BE ubrajaju se i porast koncentracije slobodnih radikala, odn. reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (ROS, RNS), jona kalcijuma, malih molekula poput azot-monoksida (NO), proteina p53, egzozoma itd. (38). Dokazano je da protein kinaza C (PKC), osim što je ključni enzim u ćelijama koji ima važnu ulogu u prenosu signala i regulaciji brojnih ćelijskih procesa, takođe ima i veoma značajnu ulogu u BE. Pomenuti enzim se smatra važnim regulatorom zračenjem indukovane apoptoze.

Takođe, značajnu ulogu u nastanku neciljanih efekata zračenja ima i aktivacija određenih gena koji su uključeni u inflamatorne puteve, a do koje dolazi delovanjem ROS nastalih u ćeliji. Najvažniji od njih su mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (MAPKs), nuklearni faktor kapa B (NFkB), inducibilna azot-oxid sintaza (iNOS) i ciklooksigenaza-2 (COX-2) (slika 5). Njihovom aktivacijom dolazi do pokretanja inflamatornog odgovora i proizvodnje NO što dalje vodi oksidativnom stresu kao i sintezi određenih prostaglandina, medijatora inflamacije (PG-E2 i PG-I2) koji su zaslužni za pojavu simptoma inflamacije (33).



Slika 5. Shematski prikaz signalnih puteva tokom BE. Prilagođeno prema (39)

Osim navedena tri neciljana efekta jonizujućih zračenja, do smrti tumorskih ćelija dolazi i usled efekta „unakrsne vatre” (CF, engl. „cross-fire“ efekta), tj. usled apsorpcije energije jonizujućeg zračenja u ćelijama koje se nalaze u okolini ćelije za koju je „vezan” radionuklid (slika 6).



Slika 6. Mehanizmi delovanja radionuklidne terapije: cross-fireefekat (CF, preklapanje crvenih krugova) i BE (plavi krug, RIBE) i AE (AbsE, zeleni kvadrat). Prilagođeno prema (40)

Iz literaturnih podataka se može zaključiti da neciljani efekti jonizujućih zračenja imaju značajan uticaj na krajnji efekat primene zračenja u terapiji karcinoma. Pozitivnim efektom se smatra letalno ili potencijalno letalno (kada može, a i ne mora doći do smrti ćelije, a zavisi od spoljnjih faktora: faze ćelijskog ciklusa, LET i specifične jonizacije, prisustva O_2 , radiosenzitivnih sredstava, radioprotektora, da li je zračenje primenjeno kontinuirano ili frakcionarno, hipertermije) oštećenje tumorskih ćelija i njihovih metastatskih lezija. Neželjeni efekat je u slučaju kada dolazi do citogenetskih oštećenja odnosno genetske nestabilnosti u zdravim ćelijama organizma, uzrokujući na ovaj način sekundarne malignitete (29,41).

Da bi se izbegli neželjeni efekti jonizujućih zračenja tokom radionuklidne terapije pacijentu se daje najmanja doza koja omogućava adekvatan terapijski efekat, uz minimalno ozračivanje okolnih zdravih tkiva i organa. Zbog toga se pre radionuklidne terapije mora oceniti ukupna korist, koja mora da bude veća od moguće štete (29).

1.3. Nuklearna medicina

Nuklearna medicina je interdisciplinarna grana medicine u kojoj se primenjuju otvoreni izvori jonizujućih zračenja, radionuklidi, u dijagnostici i lečenju različitih oboljenja i stanja. Koliki je današnji značaj ove grane medicine, najbolje ilustruje podatak da se godišnje u Sjedinjenim Američkim Državama na odeljenjima nuklearne medicine obavi više od 20 miliona medicinskih procedura (42). Radioaktivni lekovi koji se koriste u nuklearnoj medicini, u dijagnostičke ili terapijske svrhe, nazivaju se radiofarmaceutici. Radiofarmaceutici se najčešće sastoje od dve komponente: radionuklida i farmaceutika (liganda). Tokom razvoja radiofarmaceutika, farmaceutik se bira na osnovu njegovog afiniteta za određeni organ ili tkivo, ili na osnovu njegovog učešća u nekom fiziološkom procesu, dok se radionuklid bira na osnovu njegovih fizičkih osobina. U dijagnostičke svrhe koriste se gama i pozitronski emiteri energije 100-200 keV i vremena poluraspada srazmernim dužini trajanja ispitivanja, dok se za terapijsku primenu upotrebljavaju pretežno beta emiteri većih energija i dužeg vremena poluraspada.

Pri koncentracijama koje se koriste za dijagnostičku primenu, radiofarmaceutici nemaju poznato farmakodinamsko dejstvo. Kod radiofarmaceutika koji se koriste u terapiji, farmakodinamsko dejstvo vodi poreklo od vrste i doze zračenja.

1.3.1. Radiofarmaceutici u dijagnostici

Nuklearno medicinske dijagnostičke procedure omogućavaju vizualizaciju organa i tkiva i ispitivanje njihove funkcije. Nakon primene radiofarmaceutika u telo pacijenta, njegova raspodela po organima i tkivima zavisi od fizičko-hemijskih osobina farmaceutika, a gama i pozitronsko zračenje koje emituje radionuklid koristi se za praćenje njegove raspodele. Najveća prednost ovih dijagnostičkih procedura je mogućnost da se otkriju funkcionalne promene u organizmu pre pojave anatomskih ili morfoloških promena (26).

Radionuklidi za primenu u dijagnostici i terapiji dobijaju se u nuklearnom reaktoru ili akceleratoru (najčešće ciklotronu). U tabeli 1 je dat pregled najčešće korišćenih radionuklida u medicini u dijagnostičke svrhe.

Tabela 1. Radionuklidi za primenu u dijagnostici (43)

Radionuklid	Vreme poluraspada ($T_{1/2}$)	Vrsta zračenja	E_γ (keV)
^{99m}Tc	6,0 h	γ	140
^{111}In	67,2 h	γ	171, 245
^{123}I	13,2 h	γ	159
^{13}N	9,96 min	β^+	511
^{18}F	109,7 min	β^+	511
^{15}O	2,07 min	β^+	511
^{68}Ga	68 min	β^+	511
^{11}C	20,4 min	β^+	511

1.3.1.1. Tehnecijum-99m (^{99m}Tc)

U svetu se godišnje, upotrebom ^{99m}Tc , obavi preko 20 miliona dijagnostičkih procedura. ^{99m}Tc se koristi u oko 85% dijagnostičkih procedura u nuklearnoj medicini. Tehnecijum je prelazni metal VIIB grupe, čiji je atomski broj 43. Otkriven je 1937. godine. Predstavlja prvi elemenat koji je dobijen veštačkim putem.

Tehnecijum-99m nastaje β^- raspadom molibdena-99. Molibden-99 β^- raspadom direktno prelazi u dugoživeći ^{99}Tc (12,5%), dok 87,5% prelazi u metastabilni ^{99m}Tc , koji zatim izomernim prelazom, sa vremenom poluraspada od 6,02 časa prelazi u ^{99}Tc . Dugoživeći ^{99m}Tc β^- raspadom sa vremenom poluraspada od $2,14 \times 10^5$ godina prelazi u stabilni izotop rutenijuma - ^{99}Ru (44).

Na osnovu kriterijuma za izbor radioizotopa za dijagnostičku primenu u nuklearnoj medicini, utvrđeno je da ^{99m}Tc ima veoma pogodnu kombinaciju radijacionih karakteristika:

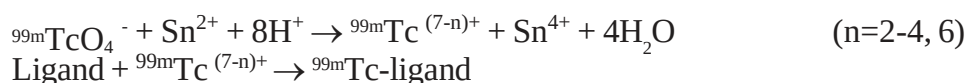
- 1) skoro čisto γ -zračenje niske energije od 140 keV-a, koje se konvencionalnim mernim instrumentima može veoma lako detektovati, tj. daje dobru prostornu rezoluciju na vizualizacionim sistemima;
- 2) skoro potpuno odsustvo primarnog β^- zračenja;
- 3) kratko vreme poluraspada od 6,02 časa, koje dozvoljava snimanje organa u različitim vremenskim intervalima i pod različitim uslovima, sa relativno malom apsorbovanom dozom zračenja;
- 4) može se koristiti u obliku pertehnetata ili u vidu obeleženih jedinjenja i bioloških elemenata za ispitivanje funkcije organskih sistema, u zavisnosti od specifične funkcije koju treba ispitati (45).

Tehnecijum-99m omogućava, uz relativno nisko izlaganje zračenju, veoma jasnu vizualizaciju unutrašnjih anatomskih struktura i organa i procenu njihove funkcije.

Eluiranjem $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generatora fiziološkim rastvorom, dobija se ^{99m}Tc u obliku natrijum pertehnetata ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) koji ima oksidacioni broj +7. To je najstabilniji oblik ovog izotopa. Rastvor natrijum-pertehnetata primenjuje se putem intravenske injekcije. Zbog sličnosti pertehnetatnog anjona i jodida (I^-) po radijusu i valenci, pertehnetat se nakuplja u štitastoj žlezdi, pljuvačnim žlezdama i sluzokoži želuca.

Kako bi ispitivanje strukture i funkcije brojnih organa ili tkiva bilo moguće, neophodno je da se različita organska ili neorganska jedinjenja (tzv. ligandi) prethodno obeleže tehnecijumom-99m. Ovi ligandi grade sa ^{99m}Tc stabilne komplekse koji imaju afinitet za određeni organ ili tkivo u organizmu. Kako se daju u veoma malim koncentracijama, rizik od toksičnog efekta kao i saturacije receptorskog sistema veoma je nizak. Da bi se mogao koristiti za obeležavanje velikog broja različitih liganada, ^{99m}Tc se iz stabilnog sedmovalentnog oblika redukuje u niža valentna stanja. U tu svrhu, koriste se različita redukciona sredstva, kao što su kalaj(II)-hlorid, kalaj(II)-citrat, gvožđe(II)-sulfat (46). Nakon redukcije u niže valentno stanje (I, III, IV ili V), ^{99m}Tc postaje visoko reaktivan jon i kao takav, pri tačno definisanim uslovima (pH vrednost rastvora, temperatura, odgovarajući molski odnos liganda i Sn^{2+} jona), gradi komplekse.

Redukcija ^{99m}Tc u kiseljoj sredini može da se prikaže reakcijom:



Poslednje dve decenije, sa ubrzanim razvojem nanočestičnih materijala i nanomedicine, velika pažnja je usmerena ka razvoju novih radiofarmaceutika na bazi nanočestica različitih struktura i dijametara (nanočestica na bazi gvožđa, zlata, micela, dendrimera, fulerena)

obeleženih različitim radionuklidima za primenu u dijagnostici i terapiji. Danas se nanočestice obeležene tehnecijumom-99m nalaze u različitim fazama pretkliničkih i kliničkih ispitivanja za primenu u dijagnostičke svrhe (46).

1.3.2. Radionuklidna terapija

Radionuklidna terapija zasniva se na selektivnoj depoziciji određenih doza jonizujućeg zračenja u tkivima tumora ili organa koji se tretiraju. Za razliku od brahiterapije, u kojoj se koriste zatvoreni izvori jonizujućih zračenja koji deluju samo u periodu dok je radioaktivni izvor u blizini tumora, radionuklidna terapija podrazumeva primenu otvorenih izvora jonizujućih zračenja. Prednost radionuklidne terapije u poređenju sa konvencionalnom hemioterapijom, koja se primenjuje sistemski, je njena selektivnost. Ova terapija cilja tumorsko tkivo uz minimalno ozračivanje okolnog zdravog tkiva.

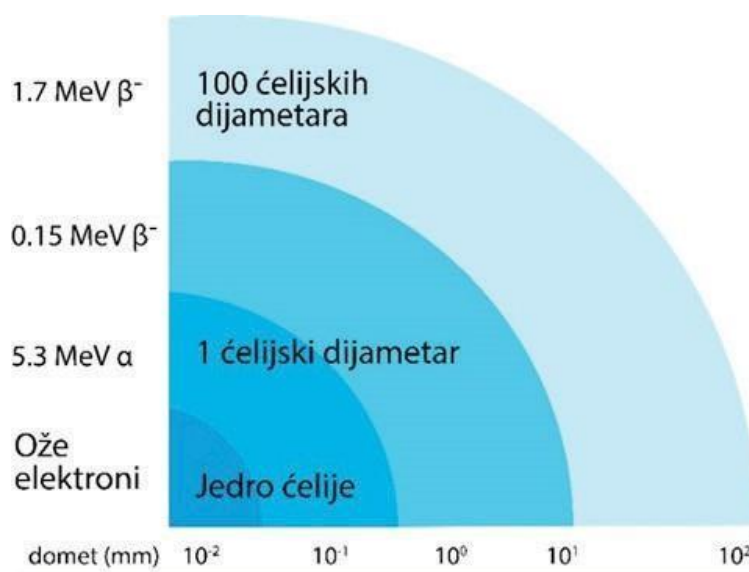
Osnovu uspešne radionuklidne terapije čini dovoljno nakupljanje i prolongirano zadržavanje specifičnog radiofarmaceutika u ciljnom tkivu, tako da radiofarmaceutik selektivno isporuči visoku efektivnu dozu zračenja obolelom tkivu (selektivno ozračuje), uz minimalno ozračivanje okolnog zdravog tkiva. Mehanizam dejstva radionuklidne terapije zasniva se na izazivanju radijacionog zapaljenja koje se kao i svaka druga inflamacija završava nekrozom i fibrozom. Pri tome, dolazi do smanjenja hiperfunkcijskog, tumorskog, hipermetaboličkog ili proliferativnog tkiva. Efikasnost i dugoročni efekti radionuklidne terapije mogu se porediti sa rezultatima nekih zastupljenijih konvencionalnih metoda lečenja, kao što su hemioterapija i radioterapija (47). Osim toga, radionuklidna terapija može predstavljati dobar izbor, kao dodatna terapija nakon hirurgije ili hemioterapije, naročito kod pacijenata kod kojih ostali terapijski pristupi nisu dali željeni efekat (48,49).

U rutinskoj kliničkoj praksi, najčešća je primena radiofarmaceutika u terapiji onkoloških pacijenata sa karcinomom štitaste žlezde. U reumatologiji se koriste za radijacionu sinovektomiju, dok su u onkologiji, osim karcinoma štitaste žlezde, terapijske indikacije: palijativno lečenje malignih izliva u serozne šupljine, terapija bola kod metastaza u kostima, kao i lečenje endokrinih tumora. Posebna je onkološka indikacija u hematologiji, lečenje prave policitemije.

Za terapiju su najpogodniji radionuklidi koji emituju α , β čestice ili Ožeeve elektrone. Kako bi ispoljilo terapijski efekat, zračenje mora da ima mali domet i visoke vrednosti linearnog transfera energije (LET). LET se definiše kao gubitak energije po dužini puta jonizujuće čestice i izražava se u keV/ μ m. Preciznije rečeno, ova veličina predstavlja kvantitativni odraz gustine jonizacije (20). Domet α -čestica (jezgro atoma helijuma – sastavljeno od 2 protona i 2 neutrona) je reda mikrometra (srednji domet u biološkim tkivima je 50-90 μ m) odnosno penetracija u tkivu iznosi oko 10 ćelijskih dijametara. Zbog relativno velike mase i energije (4-10 MeV-a), njihov LET je 400 puta veći od LET-a β čestice. Samim tim je veći i njihov terapijski efekat. Samo jedan pogodak α -čestice je u stanju da izazove dvostruki prekid lanca DNK i time spreči mogućnost reparacije, dok je za β -čestice neophodno nekoliko hiljada pogodaka da bi proizvele isti efekat (50). Takođe, u poređenju sa β -emiterima, α -emiteri su daleko pogodniji za terapiju jer omogućavaju da se energija zračenja predaje isključivo ciljnom organu ili tkivu pri čemu okolna zdrava tkiva ostaju neozračena. Međutim, nedostaci ove vrste terapije su da zbog vrlo kratkog dometa, sve tumorske ćelije moraju biti pogođene ovom česticom, dok povećana apsorbovana doza u okolnim zdravim tkivima može da dovede do razvoja sekundarnih tumora.

Beta-čestice su elektroni ili pozitroni sa visokom energijom i brzinom, koji se emituju raspadom atomskih jezgara. U radionuklidnoj terapiji koriste se negativno naelektrisane β^- -čestice (elektroni) energija do nekoliko MeV-a. U odnosu na α -čestice, elektroni imaju mnogo manju masu (preko 7300 puta manju), ali i daleko veći domet u tkivima (do 12 mm) (Domet predstavlja put koji čestica zračenja date početne energije pređe u nekom materijalu duž određenog pravca do potpunog zaustavljanja).

Na slici 7 je predstavljena korelacija između vrste i energije korpuskularnih zračenja i njihovog dometa u tkivima.



Slika 7. Korelacija između vrste i energije korpuskularnog zračenja i dometa u tkivu. Prilagođeno prema (51,52)

Izbor radionuklida za primenu u radionuklidnoj terapiji zavisi od vrste patološkog procesa koji je potrebno tretirati, njegove lokalizacije, veličine, stadijuma bolesti i dr. Iako se, teorijski posmatrano, veliki broj radionuklida može koristiti u svrhu izvora zračenja, samo mali broj njih zadovoljava uslove za primenu u medicini. U terapiji se najčešće koriste reaktorski radionuklidi: jod-131 (^{131}I), itrijum-90 (^{90}Y), lutecijum-177 (^{177}Lu), stroncijum-89 (^{89}Sr), samarijum-153 (^{153}Sm) i renijum-188 (^{188}Re). Bitne karakteristike radionuklida koje utiču na efikasnost terapije su energija čestice koju emituje i vreme poluraspada. Za primenu u terapiji, pogodni su radionuklidi sa vremenom poluraspada od nekoliko sati pa do najviše 50 dana, koliko je vreme poluraspada stroncijuma-89, koji se koristi u terapiji bola kod metastatskih promena na kostima (53). Idealno vreme poluraspada radionuklida je između 6 časova i 7 sedam dana, u zavisnosti od indikacije (51).

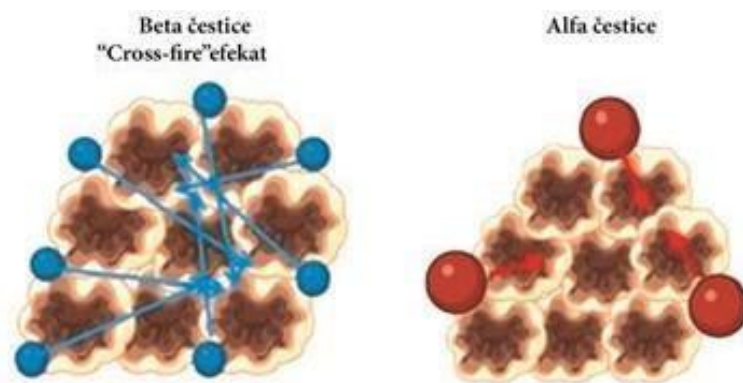
Dugoživeći radionuklidi nisu pogodni za primenu posebno u terapiji malih tumorskih lezija jer dovode do nepotrebnog izlaganja zračenju i okolnog, zdravog tkiva i značajno povećavaju apsorbovanu dozu u njima. Nasuprot tome, primenom kratkoživećih radionuklida, postoji opasnost od njihovog raspada pre dolaska do ciljnog tkiva (54).

U tabeli 2 date su osnovne karakteristike najčešće korišćenih radionuklida u terapiji.

Tabela 2. Radionuklidi namenjeni za terapijske svrhe i njihove osnovne karakteristike (55)

Radionuklid	Vreme poluraspada ($T_{1/2}$)	Vrsta zračenja i energija (keV)	Maksimalni domet u tkivu
^{177}Lu	6,73 dana	β^- (498) γ (113, 208)	2 mm
^{131}I	8,02 dana	β^- (606) γ (364)	2,5-3 mm
^{186}Re	3,72 dana	β^- (1069) γ (137)	3,6 mm
^{188}Re	17 h	β^- (2120) γ (155)	11 mm
^{153}Sm	46,3 h	β^- (808) γ (103)	3 mm
^{89}Sr	50,5 dana	β^- (1496)	8 mm
^{90}Y	2, 7 dana	β^- (2282)	12 mm
^{213}Bi	46 min	α (8300)	84 μm
^{211}At	7,2 h	α (5982)	80 μm
^{225}Ac	10 dana	α (5982)	60 – 90 μm
^{64}Cu	64 h	Ože-ov elektron	2-500 nm

Radionuklidna terapija ima prednosti u odnosu na druge oblike terapije karcinoma, među kojima se ističu: visoka efikasnost i selektivnost, minimalna invazivnost, mogućnost ponavljanja i kombinovanja sa drugim vrstama terapija. Osim toga, adekvatnim izborom radionuklida, moguće je tretirati kako primarne tumore, tako i njihove metastaze. U zavisnosti od lokalizacije tumora, stadijuma bolesti i mnogih drugih faktora, adekvatan izbor radionuklida ima odlučujuću ulogu na povećanje efikasnosti terapije. Dok su α -čestice visokoefikasne u tretmanu malignih tumora mikrometarskih dimenzija i njihovih rezidua, (leukemije, limfomi, gliomi, melanomi itd.), β -čestice su pogodnije za terapiju makroskopskih, odn. tumora većih dimenzija (milimetarskih i većih). Prednost β -emitera u terapiji makroskopskih tumora je prisustvo efekta „unakrsne vatre“ koji omogućava da primenjeno zračenje deluje i na ćelije koje nisu direktno pogođene zračenjem. Ovaj efekat podrazumeva da β -čestice pri prolasku kroz ćeliju dovode do oslobađanja elektrona, koji dovodi do jonizacije materije, a sama naelektrisana čestica menja pravac svog kretanja i nastavlja da deluje na druge atome i molekule na koje nailazi na svom putu. Dok β -čestice uglavnom proizvode jednostruke prekide DNK molekula, koji se mogu popraviti kroz specifične reparacione mehanizme, α -čestice zbog malog dometa i velikih energija, dovode do dvostrukih prekida DNK lanaca, koji se ne mogu popraviti, te dovode do ćelijske smrti. Na slici 8 predstavljene su razlike u dejstvu α - i β -čestica.

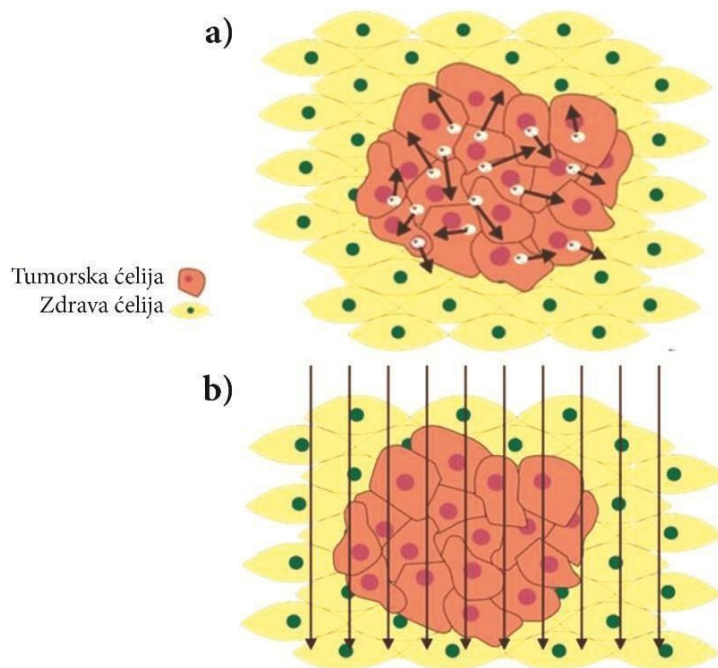


Slika 8. Dejstvo alfa i beta zračenja. Prilagođeno prema (56)

Neki radionuklidi, koji pored β -čestica emituju i γ -fotone, mogu se ujedno koristiti i za dijagnostičku procenu bolesti, a takođe i za *in vivo* praćenje efikasnosti primenjene terapije (tzv. teranostički pristup, o kome će biti reči u poglavlju 1.3.3.).

U odnosu na eksternu radioterapiju kod koje se maligni tumor u telu pacijenta izlaže spoljašnjem zračenju, tj. snopu jonizujućih zraka (energetskih talasa ili snopova elektrona, protona, neutrona), koji se generišu u uređaju koji se nalazi van tela pacijenta, kod radionuklidne terapije, radiofarmaceutik se unosi u organizam pacijenta i nakon nakupljanja u ciljnim ćelijama tumora, zračenje ispoljava svoje dejstvo. Kod eksterne radioterapije, iako snopovi jonizujućih zraka prodiru u telo na zadatom mestu i u ciljanoj željenoj dubini, zbog samog načina primene zračenja nemoguće je izbeći ozračivanje i zdravog tkiva. Kod radionuklidne terapije ozračivanje zdravog tkiva se može izbeći ili smanjiti izborom pogodnog radionuklida, odgovarajućeg farmaceutika, kao i načina primene.

Na slici 9 je prikazan način delovanja radionuklidne terapije i eksterne radioterapije.



Slika 9. Radionuklidna terapija (a) i eksterna radioterapija (b) Prilagođeno prema (57)

1.3.2.1. Lutecijum-177 (^{177}Lu)

Radionuklid lutecijum-177 je otkriven 1949. godine od strane američkih naučnika Džordža Hajnsa i Edvarda Hjueta. Za potrebe nuklearne medicine, danas se proizvodi neutronske ozračivanjem obogaćenih meta, poput iterbijuma-176 (^{176}Yb) i lutecijuma-176 (^{176}Lu), u nuklearnim reaktorima.

Lutecijum-177 ima vreme poluraspada 6,65 dana. Emisijom beta zračenja (β -čestice) maksimalne energije 498 keV i gama zračenja energije 208 keV (11%) i 113 keV (6,4%), raspada se do stabilnog hafnijuma-177 (^{177}Hf). Maksimalni domet u tkivu je 2,1 mm, što ga čini pogodnim za terapiju tumora manjih dimenzija (58).

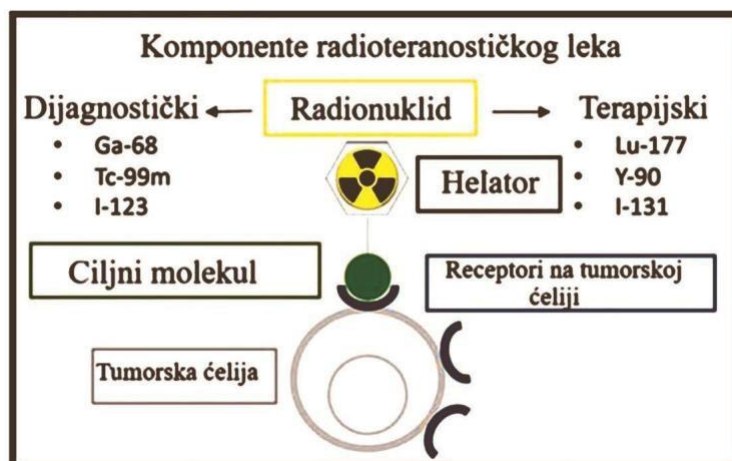
Emisija gama zračenja omogućava *in vivo* imidžing upotrebom gama kamere. Terapija primenom ^{177}Lu je manje invazivna u odnosu na neke druge metode lečenja, i ponovljiva je, što može biti korisno u slučajevima kada je potrebno primeniti veći broj tretmana za postizanje veće efikasnosti terapije.

Svedoci smo da dosadašnji konvencionalni terapijski pristupi u lečenju karcinoma imaju brojne neželjene reakcije, nedovoljnu selektivnost i malu efikasnost, posebno u lečenju uznapredovalih formi bolesti. Poslednjih desetak godina, sa naglim razvojem nanomedicine, ^{177}Lu je zbog svojih povoljnih fizičko-hemijskih osobina i lake dostupnosti postao često korišćen radionuklid, posebno u ispitivanjima primene lutecijumom-177 obeleženih nanočestica različitih hemijskih struktura i dimenzija, prvenstveno sa ciljem unapređenja terapije karcinoma, o čemu svedoče brojni naučni radovi (46,59).

1.3.3. Teranostika - budućnost nuklearne medicine

Iako je sam termin “teranostika”, koji uključuje kombinovanje metoda dijagnostike i terapije, novijeg datuma i odnosi se i na medicinske procedure koje ne uključuju primenu radionuklida, (hemioteranostika, genska teranostika, fotodinamska ili fototermalna teranostika) (60), ovaj koncept u nuklearnoj medicini datira praktično još od njenog početka, tačnije od 40-ih godina prošlog veka, kada je dr *Saul Hertz* prvi put primenio radioaktivni jod-131 i za dijagnostiku i za lečenje pacijenata sa hipertireozom (61,62). U okviru personalizovane medicine, koncept radiofarmaceutске teranostike se definiše kao primena odgovarajuće terapije za svakog pacijenta ponaosob, koja specifično deluje na bolest, dijagnostikovanu u određenom stadijumu. U teranostici se u ovu svrhu koriste radionuklidni parovi za dijagnostiku i terapiju. Oni se vezuju za isti farmaceutik, tako da radionuklidi imaju isti afinitet prema odgovarajućoj strukturi ili biološkom procesu.

Kod radionuklidnih parova, gama ili pozitronski emiteri služe kao dijagnostički agensi, čija se distribucija u organizmu može pratiti pomoću vizuelizacionih tehnika, kao što su SPECT ili PET, dok drugi radionuklid služi kao terapijski agens (najčešće α ili β -emiter), koji deluje destruktivno na tumorske ćelije (slika 10). Na ovaj način, omogućena je personalizovana i ciljana upotreba radionuklida, kao i praćenje njihove distribucije i efikasnosti terapije *in vivo*. Najčešće ispitivani teranostički parovi radionuklida su: $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$, $^{68}\text{Ga}/^{90}\text{Y}$, $^{123}\text{I}/^{131}\text{I}$ i $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$.



Slika 10. Teranostički pristup u nuklearnoj medicini. Prilagođeno prema (63)

Sa napretkom u razvoju nuklearne medicine, danas se primenjuju radiofarmaceutici kojima se mogu dijagnostikovati i lečiti bolesti poput karcinoma prostate, metastaza tumora na jetri, tumora neuralnog grebena i dr. Poslednjih petnaest godina aktuelna su istraživanja sa ciljem pronalaska novih radiofarmaceutika kojima bi se omogućila detekcija i lečenje neuroendokrinih tumora i njihovih metastaza (Tabela 3).

Tabela 3. Izdvojeni primeri teranostičkih parova (64)

Dijagnostički radiofarmaceutik	Terapijski radiofarmaceutik	Ciljni vektor	Oboljenje
$[^{123}\text{I}] \text{ I}^-$	$[^{131}\text{I}] \text{ I}^-$	NIS (SLC5A5)	Diferentovani karcinom štitaste žlezde, hipertireoza
$[^{123}\text{I}]$ -MIBG, $[^{124}\text{I}]$ -MIBG, $[^{18}\text{F}]$ -MFBG	$[^{131}\text{I}]$ I-MIBG	NET (SLC6A2)	Neuroendokrini tumori, uključujući neuroblastom, feohromocitom, paragangliom, medularni karcinom štitaste žlezde
$[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTATATE, $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTATOC, $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTANOC	$[^{111}\text{In}]$ In-pentetreotide, $[^{177}\text{Lu}]$ Lu-DOTATATE (LUTATHERA®), $[^{90}\text{Y}]$ Y-DOTATATE, $[^{225}\text{Ac}]$ Ac-DOTATATE, $[^{177}\text{Lu}]$ Lu-DOTATOC, $[^{90}\text{Y}]$ Y-DOTATOC, $[^{225}\text{Ac}]$ Ac-DOTATOC, $[^{212}\text{Pb}]$ Pb-DOTATATE	SSTRs	Neuroendokrini tumori, uglavnom gastroenteropankreasni tumor (GEP-NET)
$[^{123}\text{I}]$ MIP-1072, $[^{123}\text{I}]$ MIP-1095, $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-PSMA-11, $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-PSMA-I&T $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-PSMA-617	$[^{131}\text{I}]$ I-MIP-1095, $[^{177}\text{Lu}]$ Lu-PSMA-I&T, $[^{177}\text{Lu}]$ Lu-PSMA-617, $[^{225}\text{Ac}]$ Ac-PSMA-617	PSMA	Metastatski karcinom prostate
$[^{89}\text{Zr}]$ Zr-trastuzumab, $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-NOTA-HER2	$[^{177}\text{Lu}]$ Lu-trastuzumab, $[^{131}\text{I}]$ GMIB-anti-HER2-VHH1	HER2	Karcinom dojke, jajnika i želuca

Brojni radiofarmaceutici koji svoje delovanje zasnivaju na ovom principu, odobreni su od strane regulatornih tela (poput parova ^{68}Ga -DOTATATE- ^{177}Lu -DOTATATE i ^{68}Ga -PSMA- ^{177}Lu -PSMA) ili se nalaze u različitim fazama prekliničkih i kliničkih ispitivanja (65,66). Primenom ovako dobijenih i uparenih “pametnih” radiofarmaceutika, omogućeno je ciljano delovanje, čime se postiže selektivnije dejstvo, što za posledicu ima smanjenje toksičnosti i povećanje efikasnosti primenjene terapije, što su i glavni nedostaci konvencionalnih hemioterapeutika.

1.4. Magnetne nanočestice – primena u medicini

Lekovi bazirani na nanotehnologijama se definišu kao aktivne farmaceutske supstance (API) integrisane sa sistemima za njihovu isporuku (67). Na području Evropske unije je 2022. godine preporukom Evropske komisije, 2022/C 229/01/EU, usvojena definicija nanomaterijala prema kojoj on predstavlja prirodni ili veštački materijal, koji se sastoji od pojedinačnih, agregiranih ili aglomerisanih čestica, pri čemu najmanje 50% čestica ima jednu ili više spoljnjih dimenzija u rasponu 1-100 nm (68). Nanočestice na bazi albumina, lipozomi, PEG-ilirani proteini i polimerne micle su samo nekoliko primera nanofarmaceutika koji su već odobreni za humanu upotrebu (69).

Danas su istraživanja usmerena na pronalaženje materijala pogodnih za primenu kao kontrastnih sredstava za tzv. “imaging” ćelija, organa i sistema organa, kao i za primenu u lečenju različitih bolesti, među kojima poseban značaj ima terapija različitih vrsta karcinoma (70). Može se reći da su nanofarmaceutici danas postali najperspektivnija formulacija za kontrolisanu i ciljanu isporuku lekova, o čemu svedoče brojni naučni radovi (71–73). Do sada je Američka agencija za hranu i lekove (FDA) odobrila nekoliko nanočestičnih formulacija, dok se više njih nalaze u postupku prekliničkih i kliničkih ispitivanja.

Nanofarmaceutici uglavnom predstavljaju kombinaciju nanočestičnih formulacija i leka, jer samostalno, mali broj nanočestičnih formulacija može da ima terapijski efekat. Nanočestice su jedinstvene po svojim osobinama. Njihova prednost je selektivno zadržavanje u ciljnom tkivu tokom dužeg vremenskog perioda u odnosu na konvencionalne lekove (74). Prema hemijskoj strukturi, nanočestice se mogu podeliti na dve osnovne grupe, na organske i neorganske. Dok su organske formulacije na bazi ugljenika i ugljovodonika (lipozomi, micle, polimeri, ugljovodonični materijali - fulereni), neorganske formulacije su dosta jednostavnije strukture tj. predstavljaju nanočestice na bazi metala srebra (75), zlata (76), kobalta, nikla, gvožđa (77), oksida metala (gvožđa, titanijuma, silicijuma) ili legura metala (FeCo, FePt). Njihov značaj ogleda se u tome što se mogu koristiti i u dijagnostici i u terapiji većeg broja bolesti i stanja (78).

Zahvaljujući veličini, fizičko-hemijskim osobinama koje direktno zavisne od sastava, kontrolisanoj sintezi, mogućnostima za oblaganje njihove površine različitim funkcionalnim grupama i *in vitro* i *in vivo* stabilnosti u različitim medijumima, neorganske nanočestice predstavljaju obećavajuću formulaciju za sintezu multimodalnih dijagnostičkih, terapijskih i teranostičkih agenasa (79).

Superparamagnetni materijali su materijali na bazi kobalta, gvožđa i nikla. Međutim, kako su kobalt i nikel visokotoksični po žive organizme, najviše korišćene i izučavane od svih magnetnih nanočestica za moguću primenu u biomedicini su nanočestice na bazi oksida gvožđa, pre svih magnetit (Fe_3O_4) i maghemit (Fe_2O_3) (80). Još jedan od razloga njihove danas široke upotrebe je relativno jednostavna, brza i ekonomski isplativa sinteza, koja

omogućava dobijanje čestica željenih veličina i oblika (80). Zahvaljujući velikoj specifičnoj površini sa mogućnošću kačenja velikog broja reaktivnih funkcionalnih grupa, pogodih za vezivanje lekova, fragmenata DNK, antitela, radionuklida itd. za ciljanu isporuku, magnetne nanočestice (MNČ) su već duži niz godina u žiži interesovanja (77).

SMNČ na bazi gvožđa pokazale su brojne prednosti u odnosu na SMNČ bazirane na drugim metalima i legurama (81). Zbog povoljnih biomedicinskih osobina, a pre svih biokompatibilnosti, biorazgradivosti i netoksičnosti (82), predmet su istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji.

Nanočestice na bazi Fe_3O_4 se prema prečniku klasifikuju u 3 grupe, standardne nanočestice (60–150 nm), monokristalne (10–30 nm) i ultrafine (5–10 nm) (79). Osobine feromagnetnih materijala određene su i uslovljene domenima i domenskim zidovima. Domenski zid je prelazni sloj koji razdvaja susedne oblasti (domene) namagnetisane u različitim pravcima. Uopšteno posmatrano, magnetni materijali su multidomenski. Međutim, kada se veličina magnetnih nanočestica smanji ispod kritične veličine, formiranje domena više nije energetski povoljno, tako da čestice egzistiraju kao jednodomske. Zato se kod nanočestica dijametra oko 20 nm ili manjeg, uočava fenomen superparamagnetizma (80). Superparamagnetizam opisuje pojavu kada se svaka čestica ponaša kao atom, ali sa velikim rezultujućim magnetnim momentom, pri čemu su vektori magnetizacije čestica slučajno orijentisani (83). Do uređenja dolazi samo ukoliko se one izlože spoljašnjem magnetnom polju.

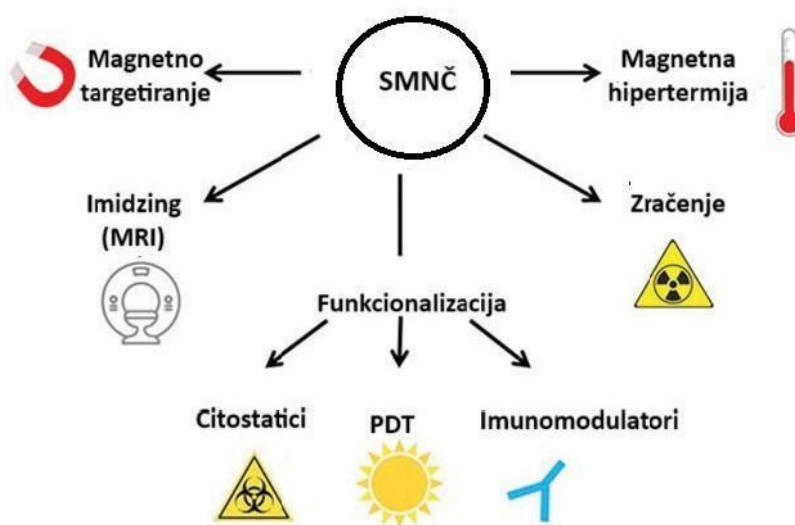
Pri izlaganju feromagnetnih nanočestica spoljašnjem magnetnom polju određene jačine i frekvencije, dolazi do generisanja toplote, tako da se tkivo u kome se čestice nađu, zagreva iznad svoje normalne fiziološke temperature (41–45°C), što dovodi do promene ćelijske homeostaze i na kraju do ćelijske smrti. Upravo je ova njihova osobina iskorišćena za magnetnu hipertermiju odnosno, ablativnu terapiju toplotom određenih vrsta karcinoma ili dopunsku terapiju (84). Prednost ove metode lečenja je što je zagrevanje tkiva ograničeno samo na tkivo u kome se nalaze SMNČ tj. na tumorsko tkivo (80). Prvi rad o upotrebi metalnih nanočestica objavili su 1957. godine *Gilchrist i saradnici*, u kome opisuju kako su tretirali limfne čvorove i metastaze pomoću magnetnog polja nakon injektovanja magnetnih metalnih čestica, a sa ciljem da pomoću lokalnog zagrevanja tkiva tumora, odn. hipertermije, unište eventualno zaostale tumorske ćelije nakon prethodnog hirurškog odstranjivanja tumora (85).

U Evropskoj uniji je 2013. godine od strane Evropske agencije za lekove, odobren za upotrebu lek pod komercijalnim nazivom Nano Therm®, koji sadrži superparamagnetne nanočestice obložene aminosilanom, a koji je indikovao u terapiji tumora CNS-a (glioblastoma), tumora prostate i pankreasa, metodom hipertermije (86).

Da bi se mogle primeniti u kontrolisanoj isporuci lekova, SMNČ moraju da poseduju neke specifične osobine, među kojima su od najvećeg značaja, uniformnost veličine i oblika (tzv. monodisperzibilnost), magnetna svojstva (superparamagnetizam), stabilnost i biokompatibilnost (83). Sintetisane, neobložene metalne nanočestice su hemijski visoko reaktivne, tako da se veoma lako oksiduju na vazduhu, što dalje dovodi do gubitka magnetizma i disperzibilnosti. Veliki problem povezan sa česticama u ovom opsegu veličina je njihova suštinska nestabilnost. Kako bi smanjile veliku površinsku energiju, ove čestice imaju tendenciju formiranja agregata i aglomerata. Stoga je za njihovu primenu važno razviti metode hemijske stabilizacije čestica u toku ili nakon sinteze (87). U literaturi se najčešće kao metoda stabilizacije opisuje oblaganje SMNČ organskim polimerima ili neorganskim jedinjenjima, metalima i metalnim oksidima. Na ovaj način se značajno menjaju njihove osobine, poboljšava stabilnost i biokompatibilnost (77, 80, 88). U osnovi

pripreme suspenzija SMNČ stabilnih u odgovarajućem medijumu i u organizmu leže 2 mehanizma – sterno odbijanje i elektrostatičko odbijanje. Sterno odbijanje se postiže oblaganjem nanočestica specifičnim jedinjenjima koji sprečavaju bliske kontakte između nanočestica (kao što su npr. masne kiseline, polivinilpirolidon (PVP), polivinilalkohol (PVA)). Elektrostatičko odbijanje nastaje usled prisustva različitih grupa, tj. anjona na površini nanočestice (90). Brojni literaturni podaci ukazuju da su fosfonati, bisfosfonati, citrati i druga jedinjenja, u mogućnosti da formiraju stabilnu vezu na površini ovih čestica (79). Sa druge strane, pomenuta jedinjenja zbog prisustva različitih grupa poput amino, karboksilne, tiolne i dr, omogućavaju vezivanje različitih liganada kao što su citostatici, antitela, radioizotopi, itd. (89).

Velike su mogućnosti primene SMNČ danas u brojnim granama medicine i nauke. Na slici 11 je dat prikaz mogućih uloga SMNČ u multimodalnoj terapiji tumora.



Slika 11. SMNČ kao formulacija za multimodalnu terapiju tumora

Radioobeležene magnetne nanočestice predstavljaju inovativnu teranostičku formulaciju koja integriše preciznu dijagnostiku i ciljanu terapiju. Dijagnostički radionuklid omogućava vizualizaciju i praćenje terapije, dok primena hipertermije pod dejstvom spoljašnjeg magnetnog polja generiše lokalizovano toplotu koja selektivno uništava tumorske ćelije. Ovaj pristup, koji kombinuje dijagnostiku i terapiju u jednom sistemu, postao je ključna strategija savremene nuklearne medicine.

Istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije usmerena su ka ispitivanju dijagnostičkih i terapijskih mogućnosti koje se pružaju SMNČ nakon radioobeležavanja.

1.4.1. Radioobeležavanje SMNČ

Radioobeležene nanočestice predstavljaju relativno novu grupu agenasa koji imaju veliki potencijal u kliničkoj primeni (91). Obeležavanje različitih čestica nanometarskih dimenzija različitim radionuklidima se koristi i za ispitivanje fizičko-hemijskih karakteristika čestica, kao i za ispitivanje njihovog biološkog ponašanja, *in vivo* stabilnosti kao i mogućnosti njihove primene u medicini (92). Na ovaj način, omogućeno je veoma jednostavno praćenje raspodele radioaktivnosti po organizmu, korišćenjem odgovarajućih detektorskih sistema (gama kamera) (93).

Prednost radioobeležavanja u proučavanju novih nanočestica leži i u činjenici da taj postupak ne dovodi do značajnije promene hemijske strukture nanočestice, njenog oblika, veličine i dr. Osim toga, od posebne je važnosti činjenica da su za određivanje biodistribucije u složenim sistemima kakvi su živi organizmi potrebne vrlo male količine nanočestica. Biodistribucija radioobeležanih jedinjenja i nanočestica u organizmu zavisi od faktora kao što su: radiohemijska čistoća, oksidaciono stanje radionuklida, pH, veličina molekula, afinitet vezivanja za proteine plazme, mogućnosti vezivanja za ćelijske receptore i dr. Jedino radiohemijski čista i homogena radioobeležena jedinjenja i nanočestice će imati kvantitativno i kvalitativno određene i ponovljive puteve biodistribucije (94). Različiti hemijski oblici radionuklida imaju različite puteve biodistribucije. Zbog toga je cilj optimizacije uslova radioobeležavanja da nagrađena hemijska veza između radionuklida i nanočestice bude stabilna, kako ne bi došlo do njenog raskidanja i oslobađanja radionuklida *in vivo*.

Kako svaki radionuklid ili njegov odgovarajući hemijski oblik, nakon unošenja u organizam, ima svoju već dobro poznatu biološku raspodelu, koja se značajno razlikuje od biološke raspodele radioobeležene nanočestice, njegovim oslobađanjem bi došlo do nepotrebnog i neželjenog ozračivanja drugih, zdravih tkiva i organa.

1.4.1.1. Metode obeležavanja SMNČ radionuklidima

U literaturi je opisano više različitih metoda obeležavanja nanočestica radionuklidima (slika 12). Metoda radioobeležavanja je jedan od važnih faktora koji utiču na stabilnost obeležene nanočestice. Veoma je važno primeniti postupak radioobeležavanja kojim se radionuklid ireverzibilno vezuje za obloženu nanočesticu. Na ovaj način se izbegava njegovo oslobađanje i nakupljanje u okolnim tkivima i organima koji nisu ciljani, čime se smanjuje apsorbovana doza zračenja u njima odnosno radiotoksični efekti.

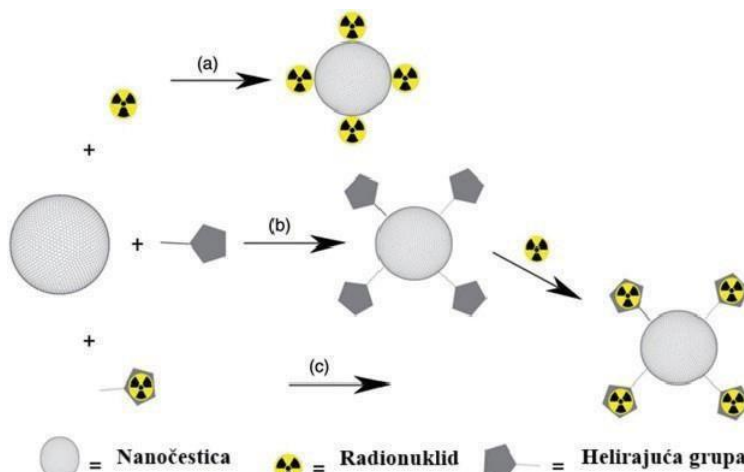
U literaturi su opisane dve osnovne metode obeležavanja SMNČ radionuklidima:

1. metoda direktnog obeležavanja (direktna reakcija građenja kompleksa između radionuklida i grupe/a na površini SMNČ) (slika 12a) i
2. metoda indirektnog obeležavanja, koja podrazumeva upotrebu bifunkcionalnog helatora.

Bifunkcionalni helator je jedinjenje koje može da gradi kompleks i sa radionuklidom i sa grupom/ama na površini SMNČ. Predstavlja vezu između SMNČ i radionuklida. Definisane su dve osnovne tehnike indirektnog radioobeležavanja:

- a) U prvoj fazi, helator gradi stabilan kompleks sa SMNČ, dok u drugoj fazi, helator vezan za površinu SMNČ gradi kompleks sa radionuklidom (slika 12b).
- b) Prvo helator da gradi stabilan kompleks sa radionuklidom, a zatim se vezuje za SMNČ (slika 12c).

Ove dve navedene tehnike se najčešće koriste za obeležavanje SMNČ trovalentnim metalima, radionuklidima poput ^{177}Lu ili ^{90}Y . Najčešće korišćeni helatori koji stvaraju stabilne kovalentne veze sa radionuklidima su DOTA (1,4,7,10-tetraazaciklo- dodekan-*N*, *N'*, *N''*, *N'''*-tetrasirćetna kiselina) i DTPA (dietilentriaminopentasilirćetna kiselina) kao i njihovi brojni derivati.



Slika 12. Metode obeležavanja SMNČ radionuklidom. (a) Direktno radioobeležavanje; (b,c) indirektno radioobeležavanje SMNČ. Prilagođeno prema (95)

Ukoliko se SMNČ oblože jedinjenjima koja poseduju fosfonatne, karboksilne i tiolne funkcionalne grupe, dobijene SMNČ će imati izrazito negativno naelektrisanje, što daje mogućnost za njihovo uspešno radioobeležavanje radionuklidima poput ^{99m}Tc i ^{177}Lu . Optimizacijom uslova obeležavanja i dobijanjem stabilnih radioobeležanih SMNČ sprečava se oslobađanje radionuklida koji se nakupljaju u različitim organima u odnosu na radioobeležene SMNČ i povećavaju primljenu nepotrebnu dozu u tim tkivima, pa tako pertehnetatni anjon ima tendenciju nakupljanja u želucu, štitastoj i pljuvačnim žlezdama (96), dok se trovalentni lutecijum-177 nakuplja prvenstveno u kostima gde ispoljava značajnu mijelotoksičnost (97).

1.4.2. Biološko ponašanje SMNČ

Ispitivanje biološkog ponašanja, odnosno praćenje distribucije leka kroz organizam, uključujući njegovu apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju, ključna je faza u razvoju novih lekova.

Pre nego što se pređe na ispitivanja na humanoj populaciji, u pretkliničkim ispitivanjima, za ispitivanje biodistribucije potencijalnih lekova, koriste se eksperimentalni životinjski modeli. Cilj je da se utvrde farmakokinetički parametri, optimalna doza, kao i način primene leka, sa ciljem postizanja optimalnog dijagnostičkog i terapijskog potencijala, uz što manje neželjenih reakcija.

Po dospeću u sistemsku cirkulaciju, nanočestice ispoljavaju karakterističnu biološku raspodelu. Dokazano je da ove čestice karakteriše brzi klirens iz sistemske cirkulacije od strane retikulo-endotelnog sistema (RES-a), kao i produženo vreme zadržavanja u jetri i slezini (98). Ulaskom SMNČ u cirkulaciju, u veoma kratkom vremenskom intervalu (reda veličine nekoliko minuta), dolazi do njihove opsonizacije u plazmi i preuzimanja od strane RES-a. Opsonizacija podrazumeva adsorpciju proteina plazme na površinu različitih stranih tela koja dospeju u cirkulaciju (bakterije, paraziti, nanočestice i dr.), obrazujući proteinski omotač, *korona*. Opsoninima pripadaju imunoglobulini (IgG, IgM), komponente sistema komplementa (C1q i C3 fragmenti) (99), kao i serumski proteini albumin, fibrinogen, C reaktivni protein, tip I kolagena i dr.) (100). Opsonizacijom nanočestice postaju vidljive za makrofage, te zatim dolazi do njihove fagocitoze. Smatra se da je proces razgradnje obloge jedne nanočestice značajno brži proces

nego što je to razgradnja metalnog dela nanočestice (101). Proces razgradnje SMNČ počinje veoma brzo nakon internalizacije u ćelije (prema nekim autorima, već nakon 3 h od i.v. injekcije), dok je gvožđe u vidu klastera prisutno i do 28 dana (102). Uočeno je da feritin igra značajnu ulogu u zaštiti ćelija od prisutnih velikih koncentracija Fe^{3+} jona (102).

U slučaju SMNČ, oblik i veličina čestica, morfologija površine, kao i njihovo površinsko naelektrisanje predstavljaju ključne faktore koji utiču na njihovo biološko ponašanje (103,104).

Poznavanje farmakokinetike nanočestica je od značaja za razvijanje formulacija koje imaju za cilj minimizaciju potencijalnih toksičnih efekata usled neželjene distribucije i nakupljanja. Menjanjem fizičko-hemijskih osobina injektovanih nanočestica (oblik, prečnik, vrsta obloge), kao i injektovane doze, može se uticati na produženje vremena cirkulacije, a time i povećanje efikasnosti u ciljanoj indikaciji (105).

Jedan od faktora koji utiče na biološko ponašanje i raspodelu SMNČ po organima, odnosno kinetiku i poluživot u plazmi, jeste veličina čestica odnosno njihov hidrodinamički prečnik (106,107). Čestice manje od 10 do 15 nm se eliminišu putem bubrega (108). Čestice dijametra većeg od 100 nm se brzo nakupljaju u jetri i slezini putem fagocitoze od strane RES-a (109). Smatra se da se podešavanjem prečnika nanočestica između 10 i 100 nm može uticati na njihovo biološko ponašanje, a time i na njihovo nakupljanje u drugim organima kao npr. limfnim čvorovima, tumorima, mozgu. Smatra se da su ovo optimalne veličine čestica ukoliko se želi prolongirano zadržavanje u cirkulaciji.

Osim veličine čestica, utvrđeno je da i priroda jedinjenja koje se koristi za funkcionalizaciju površine značajno utiče na farmakokinetičke osobine SMNČ, a kod čestica prečnika manjeg od 40 nm, čak i više nego sam prečnik (110,111). Osnovni uslov za primenu nanočestica u biomedicini je biokompatibilnost i stabilnost u *in vivo* uslovima. Biokompatibilnost zavisi i od prirode same čestice kao i od prirode obloge (101). Najčešće se kao obloge koriste mali molekuli ili polimeri, kao što su dekstran, skrob, PEG (110), limunska kiselina (112). U zavisnosti od obloge, može se postići sterna ili jonska stabilizacija nanočestica (101). Sa ciljem produženja poluživota nanočestica u plazmi, veliki naponi su uloženi proteklih godina u pronalaženje odgovarajuće obloge. Međutim, pored brojnih pokušaja, njihova primena je i dalje limitirana zbog fagocitoze od strane RES-a. Prema literaturnim podacima, hidrofilne obloge produžavaju vreme zadržavanja nanočestica u cirkulaciji (82). Od prirode obloge zavisi i površinsko naelektrisanje nanočestica. Naelektrisanje na površini nanočestice je takođe jedan od parametara koji može da utiče na biodistribuciju i klirens SMNČ. Ono ima veliki uticaj na interakciju nanočestica sa ćelijskom membranom. Pozitivno naelektrisanje potiče od amino grupa, dok negativno naelektrisanje potiče od karboksilnih ili tiolnih grupa. Naelektrisanje nanočestice utiče na interakciju sa proteinima plazme, što dalje ima uticaja na njihovo poluvreme eliminacije iz plazme (113).

Veliki broj istraživanja pokazao je da se neutralne čestice najduže zadržavaju u cirkulaciji (114), dok pozitivno naelektrisane čestice imaju najkraće poluvreme eliminacije. Negativno naelektrisane čestice su po ovom parametru između pozitivnih i neutralnih (115). Jako negativno naelektrisanje na površini nanočestice (npr. > -35 mV) smanjuje njihovu tendenciju ka agregaciji, a time i adsorpciju proteina plazme, čime im se produžava vreme zadržavanja u plazmi (82).

Rezultati brojnih eksperimenata pokazali su da funkcionalizacija površine nanočestica utiče i na smanjenje njihove toksičnosti. Smatra se da je razlog tome upravo sprečavanje njihove direktne interakcije sa biološkim površinama, čime je onemogućeno stvaranje slobodnih radikala, koje bi za posledicu moglo imati oštećenje brojnih ćelijskih struktra, pa čak i ćelijsku smrt. Osim toga, oblaganje SMNČ značajno umanjuje opsonizaciju čestica

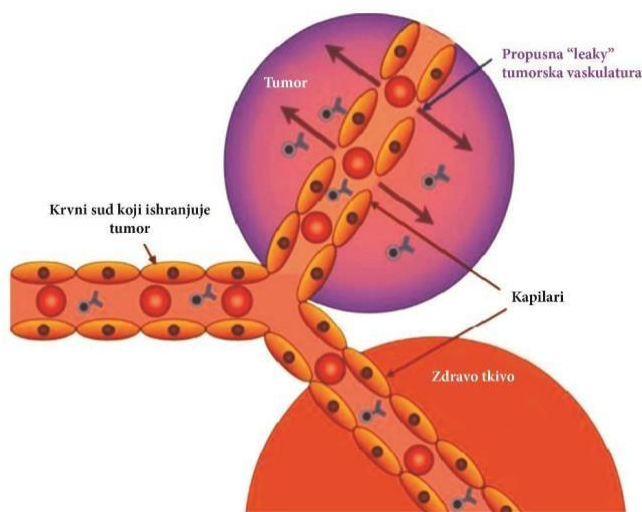
proteinima komplementa i dalje prepoznavanje od strane makrofaga, što neizbežno vodi njihovoj fagocitozi (83).

Osim prethodno opisanih faktora, na biološko ponašanje nanočestica utiče i količina injektovanih nanočestica (115). Istraživanja su pokazala da je poluvreme eliminacije iz krvi dozno zavisno. Poluvreme eliminacije iz krvi raste kada se zasite jetra i slezina, što se u praksi dešava kada se primeni 10^{15} nanočestica. Preostale čestice cirkulišu u krvi duže vreme i na taj način imaju mogućnost da dospeju do drugih organa (npr. tumorskog tkiva). Poluvreme eliminacije kod glodara je kraće nego kod čoveka, zbog bržeg metabolizma, što se odražava kroz razlike u brzinama otkucaja srca (670 otkucaja u minuti u miša, 420 u pacova, a 75 u čoveka). Takođe, poluvreme eliminacije nanočestica se povećava sa starošću organizma, iz razloga smanjene fagocitne aktivnosti makrofaga (116).

1.4.2.1. Terapijska efikasnost nanoformulacija nakon intravenske (i.v.) primene

Protekle tri decenije obeležila su intenzivna istraživanja različitih formulacija za ciljanu isporuku lekova baziranih na nanotehnologijama. Ove formulacije su tako postale glavna strategija kada je u pitanju ciljana terapija karcinoma. Nanofarmaceutici su prepoznati kao lekovi čijom primenom bi se značajno mogla povećati efikasnost u odnosu na toksičnost, što predstavlja osnovni problem kod klasičnih lekova koji su danas u upotrebi (117). Za veću efikasnost nanofarmaceutika zaslužna je povećana permeabilnost krvnih sudova tumora i povećano zadržavanje nanočestica u tumorskom tkivu (tzv. EPR efekat, engl. *enhanced permeability and retention*). Tumori čije krvne sudove odlikuje visoka propustljivost predstavljaju dobre kandidate za ovaj vid terapije. Nasuprot kapilarima zdravih organa kojima su endotelne ćelije usko priljubljene jedna uz drugu, novoformirane tumorske krvne sudove odlikuje abnormalna građa u vidu prisustva širokih fenestracija između ćelija (slika 13) (118).

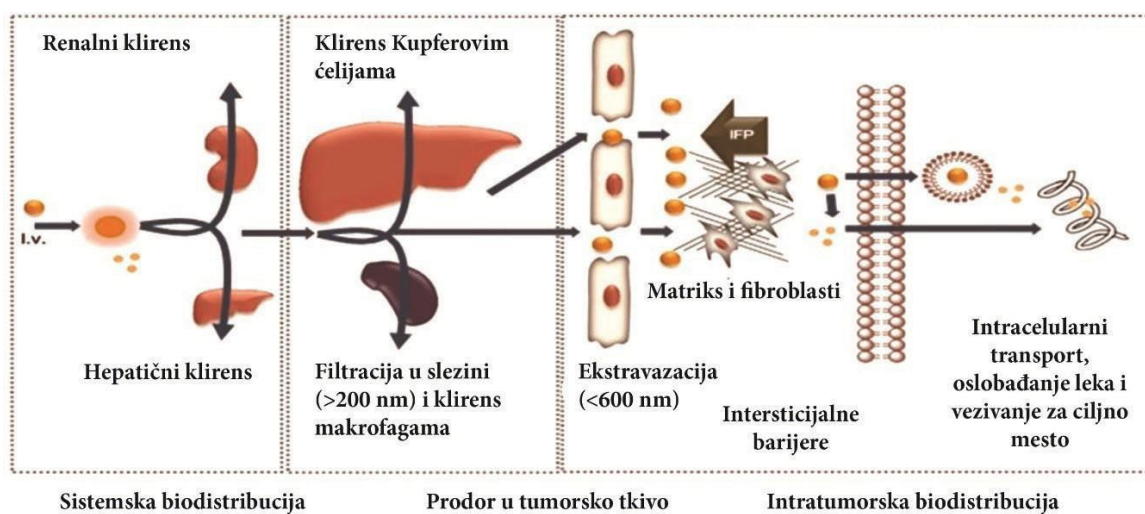
U zavisnosti od tipa tumora i stadijuma bolesti, veličina pora iznosi između 400 i 600 nm (119). Usled ovakve građe, krvni sudovi tumora daleko su propustljiviji od zdravih, što omogućava lakši prolaz hranljivih materija i kiseonika, kao i terapijskih agenasa uključujući i nanočestica iz sistemske cirkulacije u tumorski intersticijum. Istovremeno zbog smanjenog limfnog drenažnog sistema, tumori mogu zadržavati veće količine nanočestica. Sa druge strane, konvencionalni lekovi u terapijskim dozama u stanju su da neometano difunduju kroz endotel krvnih sudova celog organizma, usled čega imaju potencijal da uzrokuju brojne neželjene reakcije (120).



Slika 13. Efekat EPR omogućava neometan prolaz nanočestica iz sistemske cirkulacije u tkivo tumora. Prilagođeno prema (121)

Nanočestice bi trebalo da budu tako formulisane da nakon intravenskog injektovanja izbegnu prepoznavanje i uklanjanje od strane RES-a, čime se omogućava duže zadržavanje u sistemske cirkulaciji i bolja isporuka terapijskih agenasa tumorskom tkivu (Slika 14). Međutim, u praksi je pokazano da bez obzira na nanočestičnu formulaciju, najveći procenat nanočestica, injektovanih i.v. biva uklonjen od strane RES-a i pre nego što dospeju do ciljnog, tumorskog, tkiva (122). Zbog toga, razumevanje interakcije između nanočestica i RES-a je ključno za razvoj bezbednih i efikasnih nanomedicinskih terapija.

Osim toga, kada se čestice uspešno transportuju iz krvnih sudova u tkivo tumora, da bi se postigao optimalni efekat terapije, neophodna je njihova ravnomerna distribucija u tkivu tumora. Međutim, tumorska stroma, koja se sastoji od vezivnog tkiva, krvnih sudova i ćelija imunskog sistema, kao i pritisak u njoj, često stvaraju fizičku barijeru koja može značajno uticati u sprečavanju penetracije čestica kroz nju i ciljanju tumorskih ćelija.

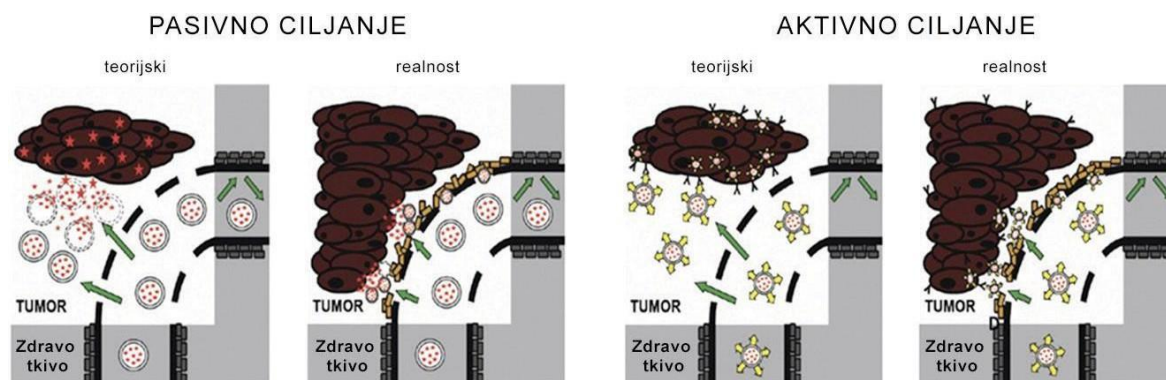


Slika 14. Biodistribucija nanočestica nakon i.v. primene. Prilagođeno prema (67)

Različiti postupci se primenjuju kako bi se unapredila efikasnost dostave formulacija u ciljna tkiva nakon intravenske primene, poput oblaganja nanočestica različitim oblogama i/ili funkcionalizacije površine nanočestica različitim tumor specifičnim ligandima, antitelima, citostaticima, radionuklidima (123,124). Iako su publikovani obećavajući rezultati sa nanoterapeuticima, uključujući proizvode sa komercijalnim nazivima *Doxil* (lipozomalni doksorubicin za metastatski karcinom jajnika) i *Abraxane* (za albumin vezani paklitaksel indikovani za metastatski karcinom dojke), ne može se reći da su dobijeni bezbedni i efikasni lekovi (67). Iako manje toksični od konvencionalnih formulacija citostatika, ovi lekovi takođe imaju brojna neželjena dejstva (stomatitis, senzorne neuropatije, nauzeju i dr). U poslednje vreme, široko je prihvaćen stav da samo pacijenti sa visoko permeabilnim tumorima mogu imati koristi od lekova baziranih na nanočesticama (118,125). Klinički posmatrano, tumori imaju visok nivo varijacija u vaskulaturi, što dalje utiče na ekstravazaciju leka i njegovu intratumorsku distribuciju. EPR je prevashodno primećen kod solidnih tumora, u ranim fazama karcinogeneze (displaziji i hiperplaziji) (119). Zato se smatra da je i.v. primena nanočestica od koristi kod ranih stadijuma bolesti, kada su lezije manje.

Još jedan faktor koji onemogućava uspešnu terapiju i predstavlja veliki problem je činjenica koja je primećena u praksi, da se neovaskularizacija tumora vrši neravnomerno i da se ne odvija istim intenzitetom kao i deoba samih tumorskih ćelija (126). Kao rezultat, dolazi

do razvoja slabo vaskularizovanih tumora. Možda je ova činjenica ujedno i objašnjenje zašto terapija nanofarmaceuticima kod različitih vrsta tumora nije podjednako efikasna. Osim toga, primećeno je da nemaju svi tumorski krvni sudovi fenestre (pore i otvore) i samim tim povećanu sposobnost da propuštaju nanočestice. Ova pojava može biti prisutna čak i u okviru jednog tumora. Dok su određeni sudovi propustljivi i mogu da propuste nanočestice dijametra čak i do 200 nm, drugi ne mogu ni one od 3 nm (118). Kod pasivnog ciljanja tumora, često se pogrešno pretpostavlja da su svi krvni sudovi tumora jednako propusni i da svi tumori poseduju propustljive krvne sudove. Ovo može biti slučaj sa brzorastućim modelima tumora kod glodara, ali definitivno nije slučaj u humanoj populaciji, gde se značajno pojačana propustljivost krvnih sudova primećuje samo kod određenih vrsta tumora (npr. kod Kapošijevog sarkoma) i gde su samo određeni delovi tumora hiperpermeabilni. Takođe, treba napomenuti da se pri aktivnom ciljanju tumora često pogrešno pretpostavlja da ono može povećati ukupno nakupljanje lekova u tumoru. Međutim, ovo u praksi nije slučaj. Nanofarmaceutici ulaze u tumorski intersticijum putem pasivne ekstravazacije. Kako je prikazano na slici 15, nanofarmaceutici moraju da prođu kroz nekoliko slojeva ćelija poput pericita, glatkomišićnih ćelija i fibroblasta pre nego što dopru do tumorskih ćelija. Shodno tome, smatra se da je aktivno ciljanje tumorskih ćelija korisno samo za ciljanje određenih specifičnih tipova ćelija unutar solidnih tumora.



Slika 15. Pasivno i aktivno ciljanje tumorskih ćelija. Prilagođeno prema (118)

U određenim naučnim krugovima prevlađuje stav da je EPR efekat precenjen (127). Istraživanja su pokazala da samo mali procenat (oko 0,7%) ukupno primenjene doze nanočestica zapravo dospeva do solidnih tumora (128). Ovo ukazuje na to da, iako EPR efekat može biti koristan, njegova efikasnost u kliničkoj praksi je često ograničena. Tome ide u prilog i činjenica da je pomenuti efekat pretežno izučavan na animalnim tumorskim modelima, koji, prema nekim autorima, nisu pogodni iz razloga što predstavljaju brzorastuće tumore. Humani tumori pretežno nisu, u toj meri, brzorastući. Usled brzog rasta, kod animalnih tumorskih modela, razvoj novih krvnih sudova nije srazmeran rastu i razvoju krvnih sudova humanih tumora (118).

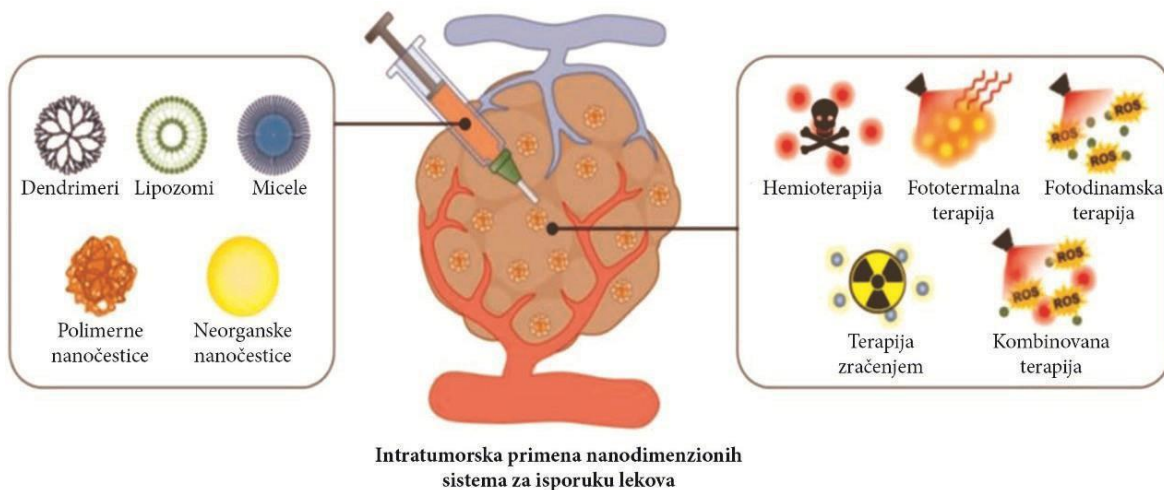
1.4.2.2. Terapijska efikasnost nanoformulacija nakon intratumorske (i.t) primene

Kako bi se prevazišla ograničenja i.v. primene, intratumorski način direktnog injektovanja nanočestičnih formulacija u tumor postao je alternativni metod (129,130).

Injektovanjem nanočestičnih formulacija direktno u tumorsko tkivo izbegava se njihovo preuzimanje od strane organa retikuloendotelnog sistema i povećava zadržavanje na ciljnom mestu dejstva (tumoru). Za razliku od brze difuzije klasičnih lekova, citostatika,

iz tumora u krvotok i okolno zdravo tkivo nakon intratumorske primene, njihova primena u vidu nanočestičnih formulacija zadržava ih na mestu primene i ključna je za efikasnost terapije (131).

Različite nanočestične formulacije bile su predmet istraživanja za intratumorsku primenu, poput lipozoma, micela, nanogelova, neorganskih nanočestica itd. Na slici 16 je prikazan metod intratumorskog injektovanja različitih nanočestičnih formulacija.



Slika 16. Intratumorski način injektovanja nanočestica. Prilagođeno prema (122)

Brojne nanočestične formulacije su prošle opsežna preklinička ispitivanja, a pojedine su došle i do faze kliničkih ispitivanja. *Nanotherm* je prvi nanoterapeutik namenjen za intratumorsku primenu, prihvaćen od strane EMA-e 2010. godine u terapiji glioblastoma i kancera prostate (132). Sastoji se od nanočestica na bazi Fe_3O_4 , prečnika 15 nm, obloženih aminosilanom. Primjenjuje se u magnetnoj hipertermiji, za ciljano zagrevanje tumora i izazivanje toplotne ablacije tumora (133). Drugi lek razvijen od strane kompanije *Nanobiotics* je lek pod komercijalnim nazivom *Hensify*, odobren 2019. godine za terapiju sarkoma mekih tkiva. Predstavlja radionuklidni pojačivač na bazi hafnijum oksida (HfO_2), veličine čestica 50 nm, obloženih negativno naelektrisanom oblogom, fosfatom. Nakon intratumorske primene i izlaganja jonizujućem zračenju, ove nanočestice generišu elektrone koji pojačavaju radijacijom indukovanu ćelijsku smrt (134). U kombinaciji sa imunoterapijom, trenutno se nalazi u prvoj fazi kliničkih ispitivanja za terapiju karcinoma pluća i drugih adenokarcinoma (NCT02805894 i NCT03589339).

Intratumorsko injektovanje nanočestičnih formulacija postaje obećavajući pristup u terapiji jer se kontrolom fizičko-hemijskih osobina nanočestičnih formulacija može uticati na njihovu distribuciju i zadržavanje u tumoru, što nije moguće istim načinom primene (i.t.) konvencionalnih lekova u molekulskom obliku (117). Brojni naučni radovi ukazuju na značajno ispitivanje i.t. primene nanofarmaceutika za dostavu radionuklida, β -emitera, sa ciljem smanjenja ozračivanja organa koji nisu od interesa za terapiju, a koje se javlja pri klasičnom, i.v. injektovanju radionuklida (135).

Jedan od zahteva koji moraju radioobeležene nanočestice da ispunjavaju je njihova stabilnost i zadržavanje u tumoru u obliku radioobeleženih nanočestica nakon i.t. primene za razliku od primene klasičnih citostatika koji su dopremljeni vezani ili inkapsulirani u nanočesticama, i otpuštaju se iz nanoformulacije na mestu dejstva. Kako slobodan radionuklid ima potpuno drugačiji farmakokinetički profil u odnosu na nanočestičnu formulaciju, njegovo oslobađanje iz formulacije i distribucija van tumorskog tkiva bi značajno povećalo apsorbovanu dozu u zdravim organima i tkivima i dovelo do njihovog

oštećenja. Zato je glavni cilj razvoj formulacije u kojoj radionuklid gradi stabilan kompleks sa nanočesticom.

Iako je pokazano da injektovanje leka direktno u tumorsko tkivo ima niz potencijalnih prednosti u odnosu na sistemsku (i.v.) primenu, određeni činioci moraju biti uzeti u obzir pri razvoju novih nanočestičnih formulacija kako bi se povećala terapijska efikasnost leka, a smanjili sporedni, neželjeni efekti. Za postizanje maksimalne terapijske efikasnosti i.t. injektovane nanočestične formulacije, idealno bi bilo da se nanočestice uniformno raspodeljuju po celoj zapremini tumora, da se zadržavaju u tumorskom tkivu dovoljno dug vremenski period, dok zračenje ne ispolji svoj terapijski efekat, kao i da se radionuklid ne oslobađa i dospeva u sistemsku cirkulaciju. Samo zadržavanjem radioaktivnosti u tumoru omogućava se postizanje zadovoljavajućeg terapijskog efekta (117). Međutim, iako je kod nekih vidova terapija neophodno da lek bude preuzet od strane tumorskih ćelija gde će da deluje, kod radionuklidne terapije nanoradiofarmaceuticima radionuklidi moraju da se dovedu i zadrže unutar ili u blizini mesta gde treba da isporuči doza zračenja, kao kod brahiterapije. Brahiterapija je vid terapije koji se već dugi niz godina primenjuje u terapiji solidnih, dobro oivičenih tumora. Postupak se sastoji u implantaciji izvora jonizujućeg zračenja u vidu iglica direktno u tumorsko tkivo ili u njegovu blizinu. Iglice se implantiraju uz upotrebu katetera sa specijalno dizajniranim aplikatorima. Radioaktivni izvori se ostavljaju u organizmu u trajanju od nekoliko dana do nekoliko meseci, a zatim se moraju ukloniti iz organizma (136). Postupak je tako dizajniran da se velika doza zračenja isporučuje ciljnom tkivu, dok okolna tkiva i organi primaju minimalnu dozu. Iz kliničke perspektive, brahiterapija je dobar izbor za karcinome dojke, prostate, cerviksa, oka, glave i vrata, bilo u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa hirurškom metodom lečenja (137,138).

Međutim, ova procedura ima i svojih ozbiljnih nedostataka koji se ogledaju u tome što je postupak invazivan i veoma često uzrokuje komplikacije poput akutnih hemoragija i infekcija. Neretko se dešava da i drugi organi budu ozračeni. Takođe, neophodno je prisustvo visoko stručnog osoblja kao i specifični uslovi rada u smislu zaštite pacijenata i osoblja od jonizujućeg zračenja. Treba pomenuti da gotovo uvek postoji opasnost od neadekvatnog postavljanja ili migracije izvora zračenja u zdravo tkivo ili susedne organe. U literaturi su opisani slučajevi da je pri postavljanju iglica u tkivo prostate došlo do neželjene migracije i ozračivanja susednih organa, bešike i debelog creva (139).

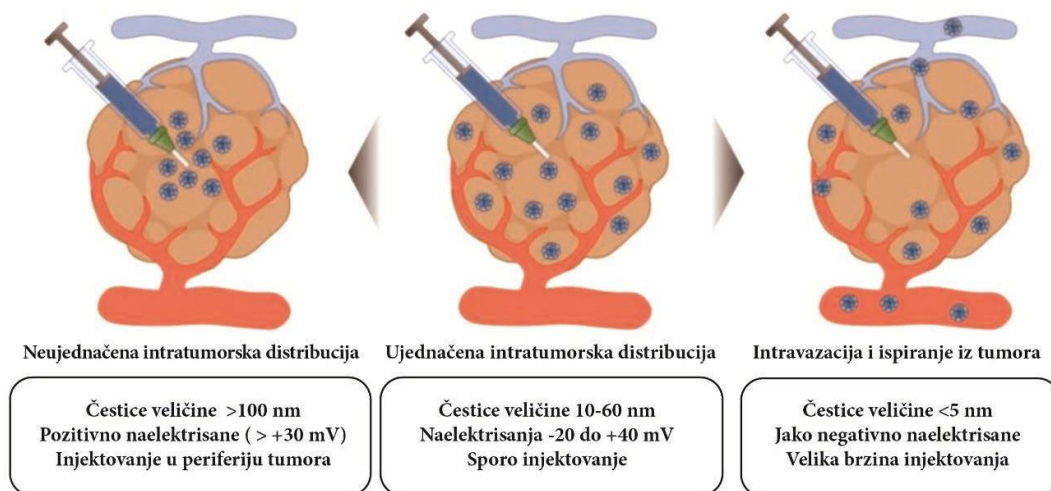
U nameri da se izbegnu pomenute negativne strane brahiterapije i da se spreči ozračivanje okolnih organa i tkiva, poslednjih decenija je došlo do ekspanzije u istraživanjima pogodnih nanomaterijala koji bi se mogli primeniti u ove svrhe, takođe i.t, ali na daleko pogodniji (komfortniji) način. Upotreba nanočestičnih materijala obeleženih radionuklidima otkrila je novi pravac u okviru nuklearne medicine, poznat kao nanobrahiterapija.

Kao alternativni pristup klasičnoj brahiterapiji, radioaktivne nanočestice se injektuju i.t, umesto implantacije iglica, što je daleko komforniji pristup po pacijenta. Osim toga, primenjene nanočestice su biorazgradive, tako da nije neophodan dodatni invazivni postupak odstranjivanja iz organizma, kao što je to neizostavno kod klasične brahiterapije. Kod brahiterapije radioaktivnim nanočesticama postoji mogućnost personalizovanog doziranja u zavisnosti od stadijuma bolesti i opšteg stanja organizma pacijenta. Još jedna prednost nanobrahiterapije je mogućnost praćenja napretka terapije neinvazivnim tehnikama poput MRI, CT, SPECT ili PET (139).

Uprkos brojnim povoljnim rezultatima kada je u pitanju istraživanje nanomaterijala, veliki je izazov dobiti funkcionalni nanomaterijal koji će biti konkurentan klasičnoj brahiterapiji. U tom cilju neophodno je dobiti radioobeleženi nanomaterijal u visokom prinosu, stabilan *in vivo*, a postupak radioobeležavanja mora biti brz i jednostavan. U

literaturi je opisan veliki broj studija koje su pokazale obećavajuće rezultate primene nanočestica u eksperimentalnim životinjama poput miševa i pasa (140).

Na terapijsku efikasnost nanočestičnih formulacija nakon i.t. injektovanja utiču kako interni faktori, odnosno osobine samog tumora, tako i eksterni faktori. Svi ovi faktori u planiranju jednog novog terapeutika moraju biti detaljno razmatrani. Na slici 17 prikazani su eksterni faktori i njihov uticaj na distribuciju nanočestičnih formulacija.



Slika 17. Faktori koji utiču na intratumorsku distribuciju i.t. injektovanih nanočestica.
Prilagođeno prema (122)

Od internih faktora na intratumorsku distribuciju injektovanih nanočestica utiču: vrsta i tip tumora (biologija tumora), stadijum bolesti (veličina tumora), vaskularizacija tumora, osobine tumorskog mikrookruženja (TME), gustina i struktura strome, mreža krvnih sudova tumora, intersticijalni pritisak tečnosti unutar tumora (IFP).

1.4.2.2.1. Tumorsko mikrookruženje (TME)

Građa tumorskog mikrookruženja razlikuje se od građe normalnog tkiva, što se dalje odražava na intratumorsku difuziju i lokalizaciju injektovanih nanočestica. Jedna od glavnih karakteristika je prisustvo visokopropusnih, abnormalnih krvnih sudova koji su nepravilno organizovani i raspoređeni pretežno na njegovoj periferiji, dok limfni sudovi nisu dovoljno razvijeni (141,142). Sa jedne strane, ovakvi krvni sudovi omogućavaju ulazak nanočestica (tzv. EPR efekat), ali sa druge, dovode do povećanja IFP što dalje otežava penetraciju unetih nanočestica u tkivo tumora (143).

Sledeća karakteristika tumorskog mikrookruženja jeste velika gustina ekstracelularnog matriksa i strome, što takođe ometa ravnomernu distribuciju injektovanih nanočestica po tkivu tumora. Tumorske ćelije su okružene bazalnom membranom, pericitima, fibroblastima, različitim vrstama ćelija imunskog sistema, tumorskim makrofazima (TAM), ekstracelularnim matriksom. Svi oni zajedno čine stromu tumora. Stroma je predominantna masa svakog tumora. U ekstracelularnom prostoru tumorskog tkiva je prisutno preko 300 različitih komponenti, uključujući fibrozne molekule, proteoglikane, glikoproteine, glikozaminoglikane i druge. Najvažniji među njima su glikoproteini i kolagena vlakna. Prema literaturnim podacima, upravo oni predstavljaju glavnu prepreku za distribuciju nanočestica kroz tkivo tumora (117). U poređenju sa zdravim tkivom, tumorsko sadrži veće količine kolagena tipa I (proizvode ga fibroblasti povezani sa tumorima-CAF) (144–146).

Takođe i faktori poput visoko eksprimiranih enzima i IL-1, IL-6, LOX (lizil oksidaza) utiču na povećanje gustine ekstracelularnog matriksa. Sve navedeno je i razlog zašto matriks predstavlja barijeru za distribuciju nanočestica u odnosu na konvencionalne lekove (molekule). Osim toga, brzodeleće tumorske ćelije dovode do povećanja intratumorskog IFP od 0 do 3 mm Hg stuba (koliko iznosi pritisak u zdravim tkivima) od 5 do 40 mm Hg koliko je izmereno u nekim vrstama solidnih tumora (117). Na periferiji tumora, IFP naglo pada na nultu vrednost (119). Takođe je bitno napomenuti da tumori većeg dijametra imaju i veći IFP kao i povećanu ekspresiju angiogenih faktora, poput VEGF, PDGF i TGF beta (147,148). Visok IFP otežava distribuciju nanočestica kroz tumor, naročito kroz one većih dimenzija. Svi ovi činioci utiču na smanjene perfuzije, odnosno otežani transport nanočestica (149).

Osnovni mehanizam distribucije nanočestica kroz tumorski intersticijum jeste difuzija. Mali molekuli, kao i strukture veličine do nekoliko nm, veoma lako difunduju kroz tumorski intersticijum, ali ga i veoma lako napuštaju. Nasuprot njima, nanočestice veće od 60 nm teško prolaze zbog interakcija sa tumorskim matriksom (150). Dokazano je da molekuli male mase i nanočestice prečnika manjih od 20 nm lako prolaze sve ove barijere, međutim, ispoljavaju zbog toga i više neželjenih efekata. Sa porastom prečnika čestica, smanjuje se njihova pokretljivost kroz tumorsko tkivo. Iz tog razloga neophodno je obezbediti nanočestice optimalnog dijametra za svaki tip tumora i njegove metastaze (119). Takođe, treba napomenuti da je kod solidnih tumora, neretka pojava da je središnji deo tumora, srž tumora, nekrotična, što dodatno doprinosi otežanoj difuziji nanočestica (151,152). S obzirom da se tumorske ćelije mnogo brže dele nego što su mogućnosti neoangiogeneze, tumori su generalno neravnomerno i slabo prokrvljena mesta (126).

1.4.2.2.2. Uticaj fizičko-hemijskih osobina nanočestica

Fizičko-hemijske osobine nanočestičnih formulacija usko su povezane sa njihovom intratumorskom distribucijom i one određuju interakciju sa strukturama tumorskog matriksa kao i njihovu difuzibilnost kroz tumorski intersticijum (117).

Faktor koji se razmatra pri planiranju formulacije novog nanofarmaceutika je veličina čestica. Kada je u pitanju intravensko injektovanje nanofarmaceutika, poznato je da veličina čestica mora biti precizno kontrolisana jer je to glavni činilac koji određuje njihovu biodistribuciju i akumulaciju u organima i tkivima. Nasuprot ovome, kod i.t. injektovanja leka, opseg veličina čestica koje se mogu primeniti je značajno širi i ide čak do mikrometarskih dimenzija (155). U svakom slučaju, kako bi se dobio povoljniji terapijski ishod, kod injektiranja direktno u tumorsko tkivo, veličina nanočestica mora biti u određenom opsegu. Čestice manjih prečnika pokazuju tendenciju slobodnog difundovanja kroz tumorsku stromu, što nije slučaj kod čestica većeg prečnika (one su manje pokretne kroz tumorski intersticijum (119). Kao primer, *Dreher i saradnici*, došli su do zaključka da nanočestice dekstrana različitih molekulskih masa pokazuju različito ponašanje u tumoru. Dok su nanočestice od 3,3 kDa (3,5 nm) lako difundovale kroz tumorski intersticijum, one od 2 MDa su ostale na mestu injektovanja. Najbolju distribuciju pokazale su čestice molekulske mase od 40 do 70 kDa (5 do 7 nm) (156).

Drugi faktori od značaja su morfologija i površinsko naelektrisanje nanočestice. Primećeno je da nanočestice u obliku iglica, odnosno duguljastog oblika, bolje difunduju kroz tumorsko tkivo od nanočestica oblika sfera ili diskova (157).

Dokazano je i da površinsko naelektrisanje ima značajnog uticaja na interakciju između nanočestica i ćelija kao i na ćelijsku internalizaciju. Neutralne čestice difunduju brže kroz tumor i homogenije se raspoređuju od pozitivno ili negativno naelektrisanih,

koje zbog naelektrisanja reaguju sa matriksom i ćelijama u tkivu tumora (158). Kako je ćelijska površina jako negativno naelektrisana, pozitivno naelektrisane nanočestice će se mnogo više internalizovati nego negativno naelektrisane ili neutralne. Jake interakcije sa ćelijama ne idu u prilog njihovoj pokretljivosti kroz tumorsko tkivo. Svakako je potrebno kontrolisati površinsko naelektrisanje jer jako negativno naelektrisanje ometa endocitozu nanočestica u ćelije. Modifikacija površine je pogodan metod kojim se može uticati na njihovu intratumorsku distribuciju. PEG se često koristi za oblaganje nanočestica kako bi se smanjenjem opsonizacije povećala njihova stabilnost i produžilo vreme boravka u cirkulaciji nakon intravenske primene. Nanočestice obložene PEG-om često se koriste u medicini zbog njihove sposobnosti da izbegnu imunski sistem, čime se smanjuje njihovo prepoznavanje i uklanjanje od strane RES-a (159).

1.4.2.2.3. Tehnika injektovanja leka

Jedan od izuzetno važnih faktora koji utiče na i.t. distribuciju nanočestica je i sama tehnika injektovanja u tumorsko tkivo. Postupak i.t. injektiranja leka, koji uključuje varijable poput injektovane doze, brzine injektovanja, lokalizacije i broja injektovanja po tumoru, značajno utiče na terapijski ishod. Preporuka je da se nanočestice injektuju u središnji deo tumorskog tkiva. Ako se injektuju na periferiji, čestice će teže doći do srži tumora zbog postojećeg IFP. Osim toga, postoji i opasnost da ulaskom u krvne sudove, nanočestice budu odstranjene iz tkiva tumora. Tehnika multiplih injektovanja u tkivo tumora pokazala se kao efikasan pristup (160). Takođe i doza, kao i brzina injektovanja moraju biti prilagođeni veličini tumorske mase. Treba istaći da u slučaju primene veće zapremine leka ili ako je brzina injektovanja veća, postoji opasnost da dođe do eliminacije leka iz tumora, a samim tim i do mogućeg ispoljavanja štetnih efekata u drugim organima. Obratno, ukoliko se nanofarmaceutik isuviše sporo injektuje, zbog prisutnog velikog IFP, postoji šansa da se neće ravnomerno raspodeliti po tumorskom tkivu, odnosno da će ostati na mestu primene. Tokom kliničkih studija neophodno je razviti metodu primene nanočestičnih formulacija direktno u tkivo tumora upotrebom, za ovu svrhu, specijalno dizajnirane dugačke igle (izuzetak je melanom, kao površinski tumor). Limitirani pristup tumorima koji su lokalizovani duboko u tkivu je osnovno ograničenje kada je u pitanju ovaj vid injektovanja leka.

Za precizno direktno intratumorsko injektovanje nanočestičnih formulacija u tkivo tumora kod čoveka potrebno je koristiti minimalno invazivne tehnike vođene radiološkim metodama vizuelizacije (rendgen, ultrazvuk, skener ili magnetna rezonanca). Ova tehnika omogućava ciljanu terapiju sa manje bola i bržim oporavkom u poređenju sa tradicionalnim hirurškim metodama, kao i manjim rizikom i manjim troškovima lečenja.

Uopšteno, i.t. način primene je pogodna metoda za API koje ispoljavaju nepovoljan farmakokinetički profil ili one sa visokom sistemskom toksičnošću. Prednosti pomenute metode su što se primenjena doza zračenja može prilagoditi konkretnom tipu i veličini tumora kao i zdravstvenom stanju svakog pacijenta ponaosob.

Iz do sada prikazanih literaturnih podataka se može zaključiti da, iako su magnetne i druge nanočestične formulacije već decenijama bile predmet brojnih *in vitro* i *in vivo* istraživanja i brojni lekovi dobili odobrenje od regulatornih tela za upotrebu u humanoj populaciji, još uvek postoji mnogo nepoznanica u vezi sa njihovim ponašanjem u živim sistemima, u pogledu toksičnosti, biodistribucije, mehanizmu dejstva, kretanju kroz krvne sudove, tkiva itd. (83).

2. CILJEVI I RADNE HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

Osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije je razvoj novih radiofarmaceutika na bazi obloženih superparamagnetnih nanočestica obeleženih radionuklidima tehnećijumom-99m i lutecijumom-177 za potencijalnu primenu u dijagnostici i terapiji karcinoma kroz:

- 1) sintezu stabilnih biokompatibilnih SMNČ i ispitivanje uslova za njihovo oblaganje biokompatibilnim jedinjenjima (HEDP, MDP i DMSA);
- 2) fizičko-hemijsku karakterizaciju neobloženih i obloženih SMNČ;
- 3) određivanje SAR vrednosti obloženih SMNČ;
- 4) ispitivanje uslova obeležavanja obloženih SMNČ sa ^{99m}Tc i ^{177}Lu ;
- 5) ispitivanje biološke raspodele radioobeleženih SMNČ po organima eksperimentalnih životinja (pacovi i miševi);
- 6) *in vivo* ispitivanje terapijske efikasnosti radioobeleženih SMNČ na ksenograft modelu 4T1 ćelijske linije mišjeg karcinoma dojke i CT-26 ćelijske linije mišjeg karcinoma kolona (BALB/c miševi).

2.2. Radne hipoteze istraživanja

- 1) Odgovarajućim postupkom sinteze SMNČ na bazi Fe_3O_4 i njihovim oblaganjem sa tri biokompatibilna jedinjenja (MDP, HEDP i DMSA) dobijaju se SMNČ u vidu stabilnih nanosuspenzija, pogodnih za *in vivo* primenu.
- 2) Obeležavanjem obloženih SMNČ tehnećijumom-99m, dobijaju se *in vitro* i *in vivo* stabilne radioobeležene SMNČ koje kada se izlože spoljašnjem magnetnom polju imaju sposobnost zagrevanja i mogu da se primene kao teranostički agensi.
- 3) Obeležavanjem obloženih SMNČ lutecijumom-177 dobijaju se radioobeleženi *in vitro* i *in vivo* stabilni nanosuspenzije za primenu u radionuklidnoj terapiji tumora.
- 4) Potencijalni terapijski agens se nakon injektovanja direktno u tumorsko tkivo eksperimentalnog animalnog modela (intratumorska injekcija), zadržava u tumorskom tkivu dovoljno dug vremenski period da zračenje može da ispolji svoje terapijsko dejstvo na tumorska tkiva.
- 5) Antitumorski efekat nakon i.t. injektovanog ^{177}Lu -DMSA-SMNČ zavisi od primenjene doze zračenja i veličine tumora.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijal

Hemikalije i reagensi:

- Gvožđe(II)-sulfat, heptahidrat, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)
- Gvožđe(II)-hlorid, tetrahidrat, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)
- Gvožđe(III)-nitrat, nonahidrat $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)
- Rastvor amonijaka ($\geq 25\%$ NH_3 u H_2O) Sigma-Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)
- Etanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Merck, Darmstadt, Nemačka
- Metanol, CH_3OH , Merck, Darmstadt, Nemačka
- Etilacetat, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, Merck, Darmstadt, Nemačka
- Metilendifosfonska kiselina (MDP), Sigma-Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)
- 1-hidroksietiliden-1,1-difosfonska kiselina (HEDP) Sigma-Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)
- Kalaj(II)-hlorid, dihidrat, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt, Nemačka
- Dimerkaptoćilicarna kiselina, (mezo-2,3-dimerkaptoćilicarna kiselina, DMSA) Sigma-Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)
- Dimetilsulfoksid (DMSO), $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, Sigma-Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)
- Voda za injekcije (B. Braun Medical, SA)
- Natrijumhidroksid, NaOH , Sigma-Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)
- Hlorovodonična kiselina 37%, HCl , Merck (Darmstadt, Nemačka)
- Humani serum albumin 20% - „Zavod za transfuziju krvi”, Beograd
- Fiziološki rastvor, 0,9% NaCl , Hemofarm AD
- Rastvor penicilina (10 000 IJ) i streptomcina 10 mg/ml), Sigma -Aldrich
- RPMI-1640 medijum, Merck, Darmstadt, Nemačka
- 0,25% rastvor tripsin- EDTA, Sigma -Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)
- Ketamin, 100 mg/ml, Laboratorio Sanderson S.A. (Santiago, Čile)
- Ksilazin, 20 mg/ml, Rompun, Baier, (Puteaux, Francuska)
- Toluen, Zorka Pharma Hemija
- Hematoksilin G2, Biognost (Zagreb, Hrvatska)
- Tripin plavo, Sigma – Aldrich (Poole, Velika Britanija)
- Eozin, Sigma -Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)
- Aluminiјum sulfat, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, Merck, Darmstadt, Nemačka
- Nuclear fast red, Sigma -Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)
- Entellan®, Sigma -Aldrich *Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka)

Potrošni materijal:

- ITLC-SG trake, Agilent Technologies, SAD
- Creva za dijalizu (MWCO - 12kDa), prečnika 15 mm, širine 23 mm, Sigma-Aldrich
- Ploče sa 96 bunara, Flow Laboratories, Oldham, Velika Britanija
- Polarizovane mikroskopske pločice (Superfrost Plus, Thermo Scientific)
- Tube za centrifugiranje, 15 ml, Corning® Science, Mexico
- Boce za ćelijsku kulturu, 75 cm², Greiner Cell Star® Dish, Sigma - Aldrich
- Filter za sterilizaciju, 0,22 µm, MillexGP, Merck Millipore®

Uređaji:

- Mikrotalasna pećnica, ETHOS EASY, Milestone, Italija
- Centrifuga Beckman Avanti J-20, Beckman Coulter Life Sciences, SAD
- NaI (Tl) gama brojač, Wizard 2480, Perkin Elmer, SAD
- NaI (Tl) gama brojač, Wallac Compu Gamma Counter LKB, Finska
- Doze kalibrator, Capintec CRC-15 -β, SAD
- Gama kamera (Siemens e_cam, Duall Head, SAD)
- UV-VIS spektrofotometar, Molecular devices Spectra MAX 250, Marshall Scientific, SAD
- DM 100 uređaj, nB nanoScale Biomagnetic, Španija
- BRUKER® In-Vivo Xtreme II uređaj, Bruker, SAD
- JEOL-JEM-1010 transmisioni elektronski mikroskop, JEOL, Japan
- SmartLab® X-ray difraktometar visoke rezolucije, Rigaku, Japan
- Zetasizer Nano – ZS90 uređaj, Malvern Instruments Ltd, Velika Britanija
- Nicolet iS50 FTIR spektrofotometar, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Komora sa laminarnim protokom vazduha, 1V2, Iskra
- MPMS XL- 5 SQUID magnetometar, Quantum Design, SAD
- Kriotom, Kedi Instrumental Equipment, Kina
- Leica DM LS2 mikroskop, Leica Microsystems, Nemačka
- Canon PowerShot S70 kamera, Canon, SAD
- CO₂ Inkubator, ICB-CO₂-80/160, Thermo Scientific, SAD

Radionuklidi:

- Rastvor natrijum pertehnetata (Na^{99m}TcO₄), dobijen je eluiranjem ⁹⁹Mo/^{99m}Tc generatora, proizvedenog u Laboratoriji za radioizotope, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.
- Rastvor lutecijum-177 hlorida (¹⁷⁷LuCl₃), kupljen je od ITM Oncologics GmbH (Nemačka)

3.2. Sinteza SMNČ na bazi Fe_3O_4

3.2.1. Sinteza SMNČ taloženjem iz rastvora (metoda koprecipitacije)

Sinteza SMNČ je izvedena prema metodi koju je sedamdesetih godina prošlog veka razvio francuski naučnik Massart (161). Metoda se zasniva na taloženju nanočestica magnetita (Fe_3O_4) pri molskom odnosu Fe^{2+} i Fe^{3+} jona od 1:2 u baznom rastvoru.

U stakleni trogrli balon zapremine 250 ml, opremljen refluks kondenzatorom i termometrom, uz zagrevanje u vodenom kupatilu, prvo je uneto po 15 ml vodenih rastvora: 0,3 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,82 g) i 0,15 M $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,94 g). Smeša je zagrevana uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici do postizanja temperature od 80 °C.

Kada je postignuta temperatura, dodavanjem 20-25 ml 25% rastvora NH_3 u H_2O podešena je pH vrednost reakcione smeše (nanosuspenzije) u opsegu od 10 do 11. Mešanje nastale crne nanosuspenzije se nastavlja na magnetnoj mešalici u narednih 60 minuta, na konstantnoj (prethodno postignutoj) temperaturi. Nakon toga, u cilju taloženja formiranih magnetnih čestica, sintetisane Fe_3O_4 SMNČ, prenete su iz staklenog balona u čašu, postavljenu na spoljašnji magnet. Supernatant je dekantovanjem odvojen od taloga (tzv. magnetna dekantacija). Talog se više puta resuspenduje i ispira destilovanom vodom i supernatant dekantuje sve do postizanja pH vrednosti supernatanta između 7 i 8. Kako bi se dobijena nanosuspenzija mogla koristiti za dalja istraživanja, dobijeni crni talog Fe_3O_4 SMNČ (0,522 g) je zatim resuspendovan u 30 ml redestilovane vode.

3.2.2. Sinteza SMNČ metodom koprecipitacije

uz završni kiselinški tretman prečišćavanja

SMNČ su sintetisane istim postupkom i pod istim reakcionim uslovima kao što je prethodno navedeno. U dobijenu nanosuspenziju nakon ispiranja i magnetne dekantacije, dodato je 30 ml 2 M HNO_3 da bi se kiselinškim tretmanom eliminisali mogući hidroksidi gvožđa nastali tokom reakcije koprecipitacije. Zatim je u suspenziju nanočestica dodato 150 ml 0,1 M rastvora $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ i da bi došlo do potpune oksidacije nanočestica, dobijena smeša je održavana na temperaturi ključanja tokom 30 minuta, a zatim ohlađena do sobne temperature. Nakon uklanjanja supernatanta magnetnom dekantacijom, ovaj kiselinški tretman je ponovljen još jedanput. Nakon toga, dobijeni talog je ispran acetonom, koji je zatim uparen u rotacionom vakuum uparivaču do dobijanja suvog ostatka.

3.2.3. Sinteza SMNČ metodom koprecipitacije

uz primenu mikrotalasnog tretmana

SMNČ su sintetisane metodom koprecipitacije na isti način kako je prethodno već opisano u prvom postupku. Kao nastavak procesa sinteze koprecipitacijom, korišćen je tretman u mikrotalasnom polju. Dobijena količina nanočestica (oko 0,52 g) rastvorena je u 90 ml redestilovane vode i podeljena u tri teflonske kivete, zapremine približno 30 ml po kiveti. Po propisanom protokolu kivete su zatvorene i stavljene u mikrotalasnu pećnicu (ETHOS EASY, Milestone, Italija) koja je opremljena rotorom model SK-15. Kivete su testirane na maksimalni pritisak od 100 bara. Snaga mikrotalasnog zračenja je podešena tako da bude od 0 do 1000 W, uz kontrolisano linearno zagrevanje nanosuspenzije u kivetama od sobne temperature do 100°C u toku 10 minuta. Po postizanju temperatura od

100 °C, nanosuspenzije su ostavljene na toj temperaturi još 20 minuta. Nakon toga, u toku 10 minuta nanosuspenzije su hladene u samoj komori, a zatim su izvađene i ohlađene do sobne temperature. Pomoću spoljašnjeg permanentnog magneta, nanočestice se istalože i odvoje od supernatanta. Talog je ispiran redestilovanom vodom nekoliko puta do negativne reakcije na hloride i sulfate, a zatim dispergovan u redestilovanoj vodi. Jedan deo dobijenih nanočestica je sušen preko noći na temperaturi od 50 °C i za dalja istraživanja sprашen u porcelanskom avanu.

3.3. Postupak funkcionalizacije sintetisanih SMNČ

3.3.1. Oblaganje SMNČ bisfosfonatima HEDP i MDP

Postupak funkcionalizacije površina nanočestica bisfosfonatima, 1- hidroksietiliden-1,1-difosfonskom kiselinom (HEDP) i metilendifosfonskom kiselinom (MDP), izveden je prema metodi koju su 2017. godine razvili Radović i saradnici (162). U dva reakciona balona zapremine 50 ml prenesena je po trećina sintetisanih magnetitnih čestica (~174 mg), dobijenih metodom koprecipitacije. U svaki balon je dodato po 2 ml vodenog rastvora HEDP ili MDP (350 mg, pH 8-9), tako da je molski odnos između Fe_3O_4 i bisfosfonata bio 1:2. Za podešavanje pH vrednosti vodenih rastvora HEDP i MDP korišćen je 25% rastvor NH_3 . Zatim je nanosuspenzija magnetita i bisfosfonata konstantno mešana tokom 2 časa na temperaturi od 30 °C. U cilju uklanjanja viška molekula bisfosfonata, nanosuspenzije čestica su prenete u creva za dijalizu (12kDa MWCO) i dijalizirane tokom 24 časa u 2 l vode, na sobnoj temperaturi do postizanja pH vrednosti nanosuspenzija između 7 i 8. Nakon toga, nanosuspenzije bisfosfonatima obloženih SMNČ pažljivo su prenete iz creva za dijalizu u staklene bočice zapremine 20 ml.

3.3.2. Oblaganje SMNČ sa DMSA

Za funkcionalizaciju mezo-2,3-dimerkaptoćilibarnom kiselinom (DMSA), preostala trećina magnetitnih nanočestica (~174 mg) preneti je u treći reakcioni balon zapremine 50 ml, gde je dodato 10 ml 0,8 M rastvora DMSA u DMSO. Molski odnos između Fe_3O_4 i DMSA bio je 1:2, a pH vrednost nanosuspenzije podešena je na približno 6.

Nanosuspenzija je nakon toga kontinuirano mešana na magnetnoj mešalici u naredna 24 sata na temperaturi od 30 °C. Nakon toga, višak molekula DMSA je uklonjen postupkom dijalize na prethodno pomenut način.

3.4. Metode fizičko-hemijske karakterizacije sintetisanih SMNČ

3.4.1. Elektronska mikroskopija

Raspodela veličina sintetisanih SMNČ i njihova morfologija određeni su korišćenjem transmisiona elektronske mikroskopije (TEM) na JEOL-TEM 1010 (JEOL, Tokyo, Japan) mikroskopu pri radnom naponu od 100 kV. Uzorci za TEM merenja pripremani su tako što su sintetisane SMNČ najpre dispregovane u vodi, a zatim nakapavane na bakarne mrežice obložene slojem ugljenika i ostavljene na sobnoj temperaturi da rastvarač ispari. Za obradu slika je korišćen *Image J* softver u manuelnom modu. Srednja veličina i statistička raspodela čestica po veličini su procenjene merenjem najvećeg unutrašnjeg prečnika 350

čestica po uzorku. Nakon toga, podaci su fitovani na normalizovanu logaritamsku funkciju, prema formuli (1) da bi se odredili srednji dijametar (d_{TEM}), standardna devijacija i indeks polidisperznosti SMNČ (PDI - eng. Polydispersity index). Kod ove vrste merenja, parametar PDI se smatra apsolutnom greškom merenja i mera je heterogenosti uzorka.

$$y = y_0 + \frac{A}{\sqrt{2\pi\omega x}} \exp \frac{-[\ln \frac{x}{x_c}]^2}{2\omega^2} \quad (1)$$

3.4.2. Rendgenska difrakcija na prahu

Kristalna struktura sintetisanih neobloženih i obloženih SMNČ određivana je metodom difrakcije rendgenskog zračenja na Philips PW1710 x-Ray difraktometru visoke rezolucije (Rigaku, Tokyo, Japan). Kao izvor X-zraka korišćena je rendgenska cev sa bakarnom anodom ($\text{CuK}\alpha$), pri naponu od 40 kV i struji od 30 mA. Uzorak je pripremljen nanošenjem i ravnanjem na silikonskom podmetaču nulte pozadine. Difraktogrami su snimani u opsegu 2θ od 10 do 70 stepeni, sa korakom 0.06 i vremenom zadržavanja od 50 s po koraku. Srednja veličina kristalita (d_{XRD}) je određena pomoću Šererove jednačine:

$$d_{\text{XRD}} = K \cdot \lambda / \beta \cdot \cos \theta \quad (2)$$

gde je K je Šererova konstanta (faktor oblika), λ je talasna dužina rendgenskog zračenja (nm), β je širina pika na polovini visine (rad), a θ je Bragov ugao difrakcije pika ($^\circ$). Vrednosti d_{XRD} su izračunate kao srednja vrednost najintenzivnijih refleksija.

3.4.3. Dinamičko rasejanje svetlosti i zeta potencijal

Metoda dinamičkog rasejanja svetlosti – DLS je metoda analize difrakcije laserske svetlosti usled interakcije svetlosti sa česticama. Za određivanje raspodele veličina sintetisanih obloženih SMNČ metodom dinamičkog rasejanja svetlosti korišćen je uređaj Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Velika Britanija). Kao izvor svetlosti, ovaj uređaj koristi 4 mW He-Ne laser ($\lambda = 633$ nm). Proizvedena svetlost interaguje sa česticama koje su u stalnom kretanju (Braunovo kretanje), što rezultuje rasipanjem svetlosti sa čestica u svim pravcima. Detektor koji detektuje fluktuacije intenziteta rasute svetlosti se nalazi pod uglom od 90° u odnosu na pravac upadne svetlosti. Merni opseg instrumenta je 6 nm do 6 μm . Uzorci su nakon razblaživanja redestilovanom vodom (10 mg/ml) mereni u odgovarajućim kvarcnim kivetama (DTS 1070). Izračunavanjem translacionog difuzionog koeficijenta primenom Stokes Einsteinove jednačine (163), određen je hidrodinamički prečnik sintetisanih SMNČ.

Isti uređaj korišćen je i za određivanje zeta potencijala koji karakteriše naelektrisanje na površini magnetnih čestica. Zeta (ζ) potencijal predstavlja efektivno naelektrisanje čestice u određenom medijumu, a samim tim i meru elektrostatičkih odbijanja, odnosno stabilnosti nanodisperznog sistema. Vrednost zeta potencijala zavisi kako od strukture same površine sintetisanih SMNČ, tako i od pH vrednosti medijuma. Što je veće naelektrisanje na površini nanočestica, to će one biti manje podložne agregaciji u rastvoru, odnosno lako se redisperguju usled jakih odbojnih sila među česticama što dovodi do veće stabilnosti sistema (164). Pod stabilnošću nanodisperznih sistema se podrazumeva zadržavanje čestica u dispergovanom stanju i posle dužeg perioda vremena (od jednog dana do godinu dana).

Zeta potencijali neobloženih, kao i obloženih SMNČ određeni su na $25,0 \pm 0,1$ $^\circ\text{C}$, u opsegu pH 6-7 i konstantnoj jonskoj jačini $I = 0,01$ M, koja je prethodno podešena dodatkom 0,9% rastvora NaCl. Za svaki uzorak urađeno je najmanje po pet merenja.

3.4.4. Furijeova transformaciona infracrvena spektroskopija

Za kvalitativnu analizu funkcionalnih grupa i strukturnu karakterizaciju neobloženih i obloženih SMNČ korišćena je Furijeova transformaciona infracrvena spektroskopija (FTIR) spektroskopija. FTIR spektri analiziranih uzoraka snimljeni su na Nicolet™ iS50 FTIR spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, SAD), u ATR (eng. attenuated total reflectance) režimu u oblasti talasnih dužina od 400 do 4000 cm^{-1} , sa rezolucijom od 4 cm^{-1} , na sobnoj temperaturi. Prah SMNČ za snimanje je pripremljen sušenjem na 50 $^{\circ}\text{C}$ u toku 24 h.

3.4.5. Magnetna merenja

Merenje magnetnih osobina neobloženih i obloženih SMNČ je urađeno na Quantum Design magnetometru MPMS-XL-5. Sprašeni uzorci čestica su homogenizovani i u količini od 50 mg su sipani u želatinske kapsule koje se zatim postave u magnetometar. Zavisnost magnetizacije od jačine magnetnog polja pri konstantnoj temperaturi merena je u intervalu od -5 T do 5 T na 300 K.

3.4.6. Određivanje specifične brzine apsorpcije (SAR)

Za određivanje efikasnosti zagrevanja obloženih SMNČ u nanosuspenziji korišćen je DM1 aplikator (DM100 serija, nB nanoScale Biomagnetic, Saragosa, Španija) opremljen temperaturnim senzorom na bazi optičkog vlakna. Kinetičke krive grejanja su snimljene u magnetnom polju jačine 300 Gs ($23,9 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$) i rasponu frekvencija od 252 do 577 kHz, u vremenskom intervalu od 180 s. Kako bi se odredile SAR vrednosti, 1 ml nanočestica koncentracije $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ je sipano u kivetu aplikatora. Kinetičke krive su izmerene upotrebom sistema optičkog vlakna, čiji je senzor uronjen u kivetu sa nanočesticama. Temperatura nanosuspenzije u toku eksperimenata je održavana ispod 65°C kako bi se minimiziralo isparavanje vode i sprečila destabilizacija čestica nastala usled promene koncentracije nanosuspenzije. Dobijene SAR vrednosti (izražene kao $\text{W} \cdot \text{g}^{-1}$ nanočestica) su procenjene fitovanjem kinetičkih krivih na linearnu funkciju u prvih 20 s metodom inicijalnog nagiba $(dT/dt)_0$ (165). SAR vrednosti su zatim izračunate iz jednačine:

$$\text{SAR} (\text{W/g}) = c_{NP} + \frac{\rho_1}{\rho_{NP}} c_1 \left(\frac{dT}{dt} \right)_{\max} \quad (3)$$

gde je C_{NP} - specifični toplotni kapacitet nanočestice ($\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), C - specifični toplotni kapacitet medijuma (vode), ρ_{NP} - gustina nanočestice u nanosuspenziji ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), ρ_1 - gustina tečnosti u nanosuspenziji ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), $(\frac{dT}{dt})_{\max}$ - maksimalni temperaturni gradijent ($\text{K} \cdot \text{s}^{-1}$)

3.5. Radioobeležavanje

3.5.1. Optimizacija obeležavanja obloženih SMNČ tehnecijumom-99m

Optimizacija uslova obeležavanja SMNČ tehnecijumom-99m sastojala se u ispitivanju uticaja različitih parametara (količinski odnos čestica i kalaj(II) jona, pH sredine, temperatura i vreme obeležavanja), na prinos obeležavanja.

Prinos radioobeležavanja SMNČ predstavlja procenat vezane radioaktivnosti za SMNČ u odnosu na ukupnu dodatnu radioaktivnost.

U 50 μ l nanosuspenzija MDP/ HEDP/ DMSA obloženih SMNČ koncentracije 5 mg/ml, dodato je od 50 do 160 μ l rastvora SnCl_2 (2,5 mg/ml u 0,5 M HCl) i nakon blagog mućkanja dodata je odgovarajuća zapremina rastvora $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ približne aktivnosti 18,5 MBq. Nanosuspenzija je dopunjena redestilovanom vodom do ukupne zapremine od 1 ml. Kod ispitivanja uticaja pH sredine, pH vrednost nanosuspenzije podešavana je na različite vrednosti u rasponu 3 - 8 dodatkom 0,5 M rastvora NaOH ili 0,5 M HCl. Suspenzija je zatim inkubirana na sobnoj temperaturi ili zagrevanjem u vodenom kupatilu na temperaturi od 95°C u vremenskom trajanju od 30 i 60 minuta. Postupkom magnetne dekantacije uz pomoć spoljašnjeg magneta, radioobeležene obložene SMNČ odvajaju se od supernatanta. Supernatant, koji sadrži slobodne jone $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ se odbacuje. Preostali talog se nekoliko puta ispira redestilovanom vodom, a zatim se disperguje u 4 ml 0,9 % rastvora NaCl za dalja ispitivanja.

3.5.2. Optimizacija obeležavanja obloženih SMNČ lutecijumom-177

Za obeležavanje obloženih SMNČ radionuklidom $^{177}\text{Lu}^{3+}$ korišćena je metoda direktnog vezivanja radionuklida za funkcionalne grupe na površini obloženih SMNČ, a koja podrazumeva inkubaciju obloženih SMNČ sa ^{177}Lu na određenoj temperaturi i pH, u određenom vremenskom trajanju.

U 1,1 ml nanosuspenzije (~ 10 mg) MDP /HEDP/ DMSA obloženih SMNČ se doda određena zapremina rastvora $^{177}\text{LuCl}_3$ približne aktivnosti 370 MBq, a pH vrednost nanosuspenzije prethodno je podešena na pH 4 (za MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ) (166) i pH 6,5 (za DMSA-SMNČ) (167) dodatkom 0,5 M NaOH ili 0,5 M HCl. Nanosuspenzija je zatim inkubirana na sobnoj temperaturi ili zagrevanjem u vodenom kupatilu na 95 °C, u vremenskom trajanju od 30 i 60 minuta. Kao i kod obeležavanja tehnećijumom-99m, postupkom magnetne dekantacije pomoću spoljašnjeg magneta radioobeležene SMNČ se razdvoje od supernatanta. Supernatant koji sadrži slobodni $^{177}\text{Lu}^{3+}$ se odbaci, dok se preostali talog ispere više puta redestilovanom vodom i nakon toga talog se disperguje u 4 ml 0,9% rastvora NaCl.

3.5.3. Određivanje radiohemijske čistoće radioobeleženih SMNČ

Određivanje radiohemijske čistoće je neophodno pre primene radioobeleženih SMNČ, jer se na osnovu nje može zaključiti koji je dominantni oblik radionuklida prisutan u suspenziji.

3.5.3.1. Određivanje radiohemijske čistoće tehnećijumom-99m obeleženih obloženih SMNČ

Radiohemijska čistoća tehnećijumom-99m obeleženih obloženih SMNČ određena je primenom uzlazne instant hromatografije na tankom sloju (ITLC). Kao stacionarna faza korišćene su papirne trake impregnirane silika-gelom (ITLC-SG trake) dužine 15 cm i širine 2 cm, dok su kao mobilna faza upotrebljeni:

- acetone (slobodni $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ putuje sa frontom mobilne faze ($R_f=0,8-1,0$), dok redukovani/hidrolizovani $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ i $^{99\text{m}}\text{Tc-SMNČ}$ ostaju na startu ($R_f=0,0$)) i
- smeša rastvarača, *piridin: sirćetna kiselina: voda*, u zapreminskom odnosu 3:5:1,5 (redukovani/hidrolizovani $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ ostaje na startu ($R_f=0,0$), dok i $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ i $^{99\text{m}}\text{Tc-SMNČ}$ putuju sa frontom mobilne faze).

U komoru za razvijanje hromatograma uzlaznom tehnikom sipa se rastvarač koji predstavlja mobilnu fazu. Komora se zatvara da bi se postigla ravnomerna zasićenost molekulima rastvarača u svim delovima komore. Na prethodno pripremljenu traku nanosi se mikropipetom 5 μ l ispitivanog uzorka na rastojanju od 2 cm od početka trake i taj položaj se označava kao startna linija (S). Zatim se traka postavi ukoso u komoru tako da nivo rastvarača ne dosegne visinu na kojoj se nalazi ispitivani uzorak, a razdvajanje počinje kada mobilna faza pod dejstvom kapilarnih sila počne da se kreće uzlazno. Razvijanje hromatograma predstavlja proces razdvajanja komponenata na tankom sloju i završava se kada front rastvarača dođe do unapred određene visine pri kraju trake. Tada se traka vadi iz komore, zabeleži se front rastvarača i traka se seče na podeoke širine 1 cm. Raspodela radioaktivnosti duž trake se određuje merenjem radioaktivnosti svakog podeoka ponaosob, u NaI γ brojaču. Identifikacija razdvojenih komponenata, vrši se izračunavanjem R_f vrednosti, a kvantitativna analiza preračunavanjem radioaktivnosti svake od komponenata u donosu na ukupnu radioaktivnost hromatografske trake i izražava se u procentima.

Kombinujući rezultate primene ova dva sistema, izračunava se radiohemijska čistoća ispitivanih tehnećijumom-99m obeleženih obloženih SMNČ (168,169). Za sva merenja primenjeni su isti geometrijski uslovi. Dobijeni rezultati predstavljeni su kao srednja vrednost tri vrednosti merenja $\pm$ standardna devijacija.

3.5.3.2. Određivanje radiohemijske čistoće lutecijumom-177 obeleženih obloženih SMNČ

Prinos obeležavanja obloženih SMNČ sa radionuklidom ^{177}Lu ispitan je određivanjem radiohemijske čistoće suspenzije lutecijumom-177 obeleženih obloženih SMNČ. Radiohemijska čistoća lutecijumom-177 obeleženih obloženih SMNČ određena je na isti način kao i kod tehnećijumom-99m obeleženih obloženih SMNČ, korišćenjem metode tankoslojne hromatografije. Kao stacionarna faza su takođe korišćene ITLC-SG trake, dok je kao mobilna faza korišćen 0,9% rastvor NaCl. U ovakvom hromatografskom sistemu lutecijumom-177 obeležene obložene SMNČ ostaju na startu ($R_f = 0,0$), dok se slobodni joni $^{177}\text{Lu}^{3+}$ putuju sa frontom mobilne faze ($R_f = 0,9-1,0$).

3.5.4. Određivanje in vitro stabilnosti tehnećijumom-99m obeleženih obloženih SMNČ i lutecijumom-177 obeleženih obloženih SMNČ

In vitro stabilnost radioobeleženih obloženih SMNČ praćena je ispitivanjem njihove radiohemijske čistoće nakon inkubiranja u fiziološkom rastvoru i humanom serumu na 37 °C, u toku određenog vremenskog intervala. Zapremine od 0,2 ml svake od ispitivanih nanosuspenzija obeleženih obloženih SMNČ dodata je u 2 ml 0,9% NaCl odnosno u 2 ml humanog seruma i inkubirano u termostatu na 37 °C. Kod tehnećijumom-99m obeleženih obloženih SMNČ, uzorci su uzimani 30 min, 1, 2 i 24 sata nakon inkubiranja, dok kod lutecijumom-177 obeleženih obloženih SMNČ, uzorci su uzimani nakon 2, 12, 24, 72, 96 i 144 sati. Radiohemijska čistoća ispitivanih uzorka određena je koristeći gore navedene hromatografske uslove.

3.6. Eksperimentalne životinje

Etička komisija Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ je podržala, a Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, u skladu sa Nacionalnim zakonom o dobrobiti životinja i Direktivom EU 2010/63/EU, odobrilo (dozvole br. 323-07-04725/2018-05 i 323-07-10153/2022-05) eksperimente na laboratorijskim životinjama (Wistar beli pacovi i BALB/c miševi). Životinje su redovno praćene od strane veterinara.

3.6.1. Wistar beli pacovi

U eksperimentalnom radu korišćeni su zdravi pacovi soja Wistar, muškog pola, telesne mase 100 ± 10 g i starosti 4 nedelje, kao i telesne mase od 300 do 350 g i starosti do 8 nedelja. Pacovi su dobijeni od Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“. Životinje su čuvane pod standardnim laboratorijskim uslovima, u prostoriji opremljenoj kavezima, gde su temperatura (22 ± 2 °C) i vlažnost (45–50%) bile svakodnevno kontrolisane. Uslovi čuvanja podrazumevali su sledeće: ciklus svetlo/ tama od 12/12 h, *ad libitum* pristup hrani i vodi (komercijalna hrana za eksperimentalne glodare u vidu peleta (Veterinarski zavod Subotica) i česmenska voda). Životinje su bile smeštane u grupama od po najviše četiri pacova, u kavezima od pleksiglasa sa piljevinom (prostirka). Kavezi su čišćeni, što je podrazumevalo i promenu prostirke, na drugi dan.

3.6.2. BALB/c miševi

U eksperimentima su korišćene ženke miševa (lat. *Mus musculus*) soja BALB/c, starosti 8-10 nedelja, telesne mase 20 ± 2 g, uzgajane u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd. Životinje su čuvane pod standardnim laboratorijskim uslovima, u posebnoj prostoriji opremljenoj P/N ventilisanim IVC kavezima (Allentown, PA, SAD), gde su temperatura (22 ± 2 °C) i vlažnost (45–50%) bile svakodnevno kontrolisane. Uslovi čuvanja podrazumevali su sledeće: ciklus svetlo/ tama od 12/12 h i *ad libitum* pristup hrani i vodi (komercijalna hrana za eksperimentalne glodare u vidu peleta (Veterinarski zavod Subotica) i česmenska voda). Životinje su bile smeštane u grupama od po najviše četiri miša, u kavezima od pleksiglasa sa piljevinom (prostirka). Kavezi su čišćeni i prostirka je menjana svaki drugi dan.

3.7. Ćelijske linije

U istraživanju su korišćene sledeće ćelijske linije:

- komercijalna linija mišjeg karcinoma dojke **4T1** (ATCC® CRL-2539™) i
- komercijalna linija mišjeg karcinoma kolona **CT-26** (ATCC® CRL-2638™)

Ćelije su nabavljene od Američke kolekcije ćelijskih kultura (eng. American Type Culture Collection, Rockville, MD, SAD).

Ćelijska linija 4T1 predstavlja tumorsku ćelijsku liniju koja se često koristi u istraživanjima tumora dojke. Jedna od ključnih karakteristika 4T1 ćelijske linije je njena sposobnost da metastazira u različite organe, uključujući i pluća. Zbog toga se često koristi

kao model za proučavanje metastatskog ponašanja karcinoma dojke. Pomenuta ćelijska linija imitira IV stadijum karcinoma dojke u humanoj populaciji, sa vremenom dupliranja od 14 h. Ćelije su epitelne morfologije i adherirajućeg tipa. Predstavljaju metastatski model koji se u animalnim studijama može aplikovati ortotopski ili subkutano singenim BALB/c ili imunokompromitovanim miševima (170,171).

CT-26 (Colon 26) je tumorska ćelijska linija koja se često koristi u istraživanjima vezanim za tumor debelog creva, uključujući ispitivanje njihove tumorogeneze, metastaziranje, terapijske procedure i imunski odgovor. Tumorske ćelije CT-26 su poznate po svojoj sposobnosti formiranja solidnih tumora koji oponašaju karakteristike tumora debelog creva kod miševa. CT-26 model se često koristi za ispitivanje terapijskih agenasa, uključujući hemioterapiju, imunoterapiju i radioterapiju. CT-26 ćelijska linija je izlaganjem BALB/c miševa mutagenu N-nitrozo-N-metiluretanu (NMU), što je rezultiralo brzorastućim karcinomom četvrtog stepena (Brattain i sar, 1980) (172). Ćelije ove ćelijske linije su adherirajućeg tipa i imaju morfologiju fibroblasta (173). Korišćene su u nekoliko stotina objavljenih studija, čime je CT-26 ćelijska linija karcinoma kolona postala jedna od najčešće korišćenih linija ćelija u razvoju lekova (174). Vreme dupliranja (engl. *doubling time*) ovih ćelija iznosi 22-24h.

Svi eksperimenti na ćelijama izvođeni su u komori sa laminarnim protokom vazduha, uz poštovanje pravila aseptičnog rada sa kulturama i pravila lične zaštite u laboratorijskom radu. Ćelije su kultivisane u standardnim laboratorijskim uslovima, u vlažnoj atmosferi u inkubatoru (Thermo Scientific, SAD) na 37 °C sa 5% CO₂. Sterilni kompletan medijum u kome su kultivisane ćelije sastojao se od 90% RPMI-1640, 10% (v/v) FBS (fetalni goveđi serum), 1% rastvora penicilin (100 IU/ml) / streptomycin (100 µg/ml)). Medijum je nakon pripreme sterilisan filtracijom korišćenjem membranskih filtera veličine pora 0,22 µm (Millex GP, Merck Millipor®) i čuvan na +4 °C do momenta upotrebe. Medijum i svi ostali rastvori koji dolaze u kontakt sa ćelijama su pre korišćenja zagrejani na 37 °C, kako bi se izbegao stresni efekat niske temperature rastvora na žive ćelije.

3.7.1. Gajenje kulture ćelija

Ćelijske linije su čuvane u krio-epruvetama (engl. *crio-vial*) uronjenim u tečni azot, na temperaturi od -196 °C. Odmrzavanje ćelija vršeno je prema standardnom protokolu. Krio-epruveta sa ćelijama se iz tečnog azota prebacuje i inkubira u toku par minuta u vodenom kupatilu na 37 °C. Delimično odleđene ćelije se zatim prenesu u epruvetu sa prethodno zagrejanim sterilnim medijumom u zapremini 9 puta većoj od zapremine ćelijske suspenzije koja se odmrzava. Ćelije se zatim centrifugiraju 4 minuta na 1000 RPM na sobnoj temperaturi. Supernatant se aspirira pomoću vakuum pumpe ili dekantuje, a ćelijski pelet se resuspenduje svežim sterilnim medijumom (~12 ml) i na kraju se ćelijska suspenzija prenese u boce za ćelijsku kulturu (Greiner Cell Star® Dish, Sigma-Aldrich, površine 75 cm²).

Odgovarajući rast ćelija obezbeđivan je redovnom zamenom kompletnog medijuma 2 do 3 puta nedeljno. Ćelije su redovno pasažirane (presejavane) u skladu sa svojim karakterističnim vremenom udvajanja (4T1 svakodnevno, a CT-26 na drugi dan) do postizanja maksimalne konfluentnosti flaska od 80%. Presejavanje ćelija podrazumevalo je postupak odlepljivanja od podloge, tj. petominutnu inkubaciju sa 1% rastvorom tripsina radi odvajanja od podloge i ponovno zasejavanje u novi sterilni flask. Na ovaj način ćelije su održavane u logaritamskoj fazi rasta. Od trenutka odmrzavanja, ćelije su pasažirane u toku 4 do 6 dana (zavisno od ćelijske linije) i tek nakon toga su korišćene u eksperimentu.

3.7.2. Brojanje ćelija

Po postizanju odgovarajuće gustine u boci za kulturu ćelija, medijum se aspirira i ćelijski monosloj se ispira dodatkom PBS-a. Zatim se doda 1% rastvor tripsina, u zapremini dovoljnoj da pokrije dno boce. Boca se zatim stavi u inkubator na temperaturu od 37 °C u toku 3-5 minuta kako bi se obezbedila odgovarajuća temperatura za maksimalno delovanje tripsina. Pod mikroskopom se zatim proveriti da li su se ćelije odlepili od zida boce (uočavaju se okrugle ćelije u suspenziji) i potom se u posudu sa ćelijama dodaje medijum u zapremini tri puta većoj u odnosu na zapreminu dodatog tripsina. Ceo sadržaj se prenese u epruvetu, centrifugira se na sobnoj temperaturi u toku 3 minuta na 1000 RPM. Supernatant se odlije, a ćelijski pelet resuspenduje u svežem medijumu.

Za brojanje ćelija korišćen je hemocitometar po Neubaueru. Brojanje se izvodi tako što se 10 µl pripremljene suspenzije ćelija homogenizuje sa 10 µl rastvora tripan plavog (Sigma - Aldrich, Poole, UK) u fiziološkom rastvoru sa dodatkom fosfata (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ i 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) (0,4 % v/v), sipa u hemocitometar i posmatra pod svetlosnim mikroskopom, pod uvećanjem 200x. Svetle, prozirne ćelije su žive, dok su tamnoplave ćelije mrtve. Ćelije su korišćene za eksperimente ukoliko broj mrtvih ćelija nije prelazio 5%. Željena gustina ćelija podešena je dodavanjem potrebne zapremine medijuma RPMI 1640, tako da je iznosila 1 x 10⁷ ćelija/ml za CT-26 i 4 x 10⁶ ćelija/ml za 4T1 ćelije.

3.7.3. Tumorski ksenografti

Ksenografti tumora dobijeni su subkutanom (s.c.) inokulacijom CT-26 i 4T1 ćelijskih linija u slabinski deo leđa eksperimentalnih životinja. Ksenograft modeli kod miševa su eksperimentalni modeli u kojima se tumorske ćelije transplantiraju u miševе. Ovi modeli se koriste za proučavanje tumorigeneze, metastaza, za proučavanje biologije tumora, kao i preklinička istraživanja različitih potencijalnih terapijskih agenasa.

U našim istraživanjima je korišćen model ektopičnog tumorskog ksenografta. To je heterotopski model jer se ćelije tumora aplikuju na mesto koje je različito u odnosu na ono mesto gde se tumor primarno razvija. Takođe, korišćeni model je i singeni model, što znači da su korišćene ćelijske linije (CT-26 i 4T1) i BALB/c miševi istog genskog porekla.

Ksenograft karcinoma kolona indukovao je jednokratnim aplikovanjem supkutane injekcije u desni obrijani bok miša. Injekcija je sadržala 1x10⁶ ćelija mišje tumorske linije CT-26 suspendovanih u zapremini od 100 µl medijuma za kulturu tkiva (RPMI 1640).

Ksenograft karcinoma dojke je takođe indukovao jednokratnim aplikovanjem supkutane injekcije u desni obrijani bok miša. Injekcija je sadržala 4x10⁵ ćelija mišje tumorske linije 4T1 suspendovanih u zapremini od 100 µl medijuma za kulturu tkiva (RPMI 1640).

Veličina tumora merena je svakog drugog dana u tri dimenzije pomoću digitalnog nonijusa, dok je zapremina tumora računata prema sledećoj formuli:

$$V(\text{mm}^3) = \frac{\text{dužina (mm)} \times \text{širina (mm)} \times \text{višina (mm)}}{2} \quad (4)$$

Kada su tumori dostigli željenu veličinu, tj. zapreminu (u opsegu 45 mm³ - 300 mm³), miševi su uključeni u dalja istraživanja.

Masa eksperimentalnih životinja merena je svakog drugog dana neposredno pre merenja veličine tumora.

3.8. Farmakokinetički profil radioobeleženih SMNČ

3.8.1. Biološka raspodela tehnecijumom- ^{99m}Tc obeleženih obloženih SMNČ u pacovima soja Wistar

Radioobeležene nanočestice, ^{99m}Tc -MDP-SMNČ, ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ ili ^{99m}Tc -DMSA-SMNČ (približne aktivnosti 2,5 MBq ; 0,1 ml nanosuspenzije sadrži 0,1 mg SMNČ) injektovane su i.v. Wistar pacovima telesne mase oko 100 g u zapremini od 0,1 ml. Životinje su zatim žrtvovane cervikalnom dislokacijom u različitim vremenskim intervalima (10 min, 1, 2 i 24 h) nakon injektiranja. Za svaki eksperiment korišćene su po tri ogledne životinje. Organi od interesa (srce, pluća, jetra, bubrezi, slezina, želudac, creva, meko tkivo, femur) i uzorci krvi (1 ml) su izvađeni, izmerena im je masa, a zatim su stavljani u staklene kivete radi merenja radioaktivnosti u NaI (TI) γ brojaču.

Raspodela po organima se izražava kao procenat injektovane aktivnosti po organu (% ID/organu) u odnosu na standard koji predstavlja aktivnost one zapremine uzorka (0,1 ml) koja je injektirana u životinju. Ukupna masa mekog tkiva (mišića), kosti i krvi se računaju kao 40%, 10% i 8% celokupne mase pacova (175). Svi dobijeni rezultati prikazani su kao srednja vrednost tri rezultata merenja $\pm$ standardna devijacija (SD).

3.8.2. Scintigrafske studije

Dinamska scintigrafija izvedena je u jednoj projekciji korištenjem rotirajuće dvoglave gama kamere (Siemens e_cam, Duall Head, SAD) sa niskoenergetskim ("low-energy") "parallel hole" kolimatorom visoke rezolucije ("high-resolution") uz korišćenje 15%-nog simetričnog energetskog prozora centriranog na 140 keV. Dobijene su slike iz 64 projekcije (40 sekundi po projekciji) uz korišćenje 256x256 matrice i polukružne orbite od 180°. Dva zdrava mužjaka pacova, telesne mase (t.m.) oko 300 g, anestetizirana su kombinacijom ketamina (100 mg/ml, Laboratorio Sanderson S.A. Santiago, Čile) u dozi od 90 mg/kg t.m. i ksilazina (20 mg/ml, Rompun, Baier, Puteaux, Francuska) u dozi od 10 mg/kg t.m. putem intraperitonealne injekcije. Snimanje pacova počinje istovremeno sa injektovanjem ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ aktivnosti oko 18,5 MBq u repnu venu i traje 60 minuta. Celokupan period snimanja je bio programirano podeljen na vremenske intervale od 10 s, 1, 10 i 60 minuta. Za svaki interval je dobijen po jedan scintigram i konstruisana je kriva prolaza ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ. Sekvencijski scintigrami i dinamske krive pokazuju brzinu prolaza ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ kroz organizam i nakupljanje u organima.

3.8.3. Biološka raspodela ^{177}Lu -DMSA-SMNČ

Biološka raspodela ^{177}Lu -DMSA-SMNČ je ispitana u BALB/c miševima sa indukovanim ksenograftima CT-26 i 4T1 tumora. ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (aktivnost 0,5 MBq/0,05 ml nanosuspenzije/0,1 mg SMNČ) injektovane su u repnu venu miševa. Životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom nakon 1, 24, 72 i 144 sata od injektovanja. Po tri miša korišćena su po tipu ksenografta, po vremenskoj tački. Organi od interesa (srce, pluća, jetra, slezina, bubrezi, želudac, creva, meko tkivo, femur, tumor), kao i uzorci krvi (1 ml) su izvađeni, izmerena im je masa, a zatim su stavljani u staklene kivete radi merenja radioaktivnosti u NaI (TI) γ brojaču.

Biološka raspodela ^{177}Lu -DMSA-SMNČ ispitana je u BALB/c miševima sa indukovanim ksenograftima CT-26 i 4T1 tumora i nakon jednokratne intratumorske injekcije. ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (aktivnost 0,5 MBq/0,05 ml nanosuspenzije/0,1 mg

SMNČ) injektovane su direktno u ksenografte i CT-26 i 4T1 tumora zapremine $\sim 100 \text{ mm}^3$. Za ispitivanja su korišćena po tri miša za svaki tip ksenografta i za svaku vremensku tačku. Prema unapred definisanom protokolu, 1, 5. i 11. dana od injektovanja radioaktivnosti, miševi su uvođeni u anesteziju pomoću intraperitonealne injekcije ketamina i ksilazina ($90/10 \text{ mg/kg}$) i snimani Bruker® *In Vivo Xtreme II* uređajem (Billerica, MA, SAD), koji omogućava detekciju radioaktivnosti, kao i dobijanje rendgenskog snimka unutrašnjih struktura tela miša. Nakon snimanja (1. i 14. dana od dana injektovanja doze), miševi su žrtvovani dislokacijom cervikalnih pršljenova. Izvađeni su organi od interesa (srce, pluća, jetra, slezina, bubrezi, želudac, creva, femur, tumor) i krv. Izmerena im je radioaktivnost u gama brojaču (Wizzard 2480, Perkin Elmer, SAD).

Biološka raspodela $^{177}\text{LuCl}_3$ ispitana je na miševima injektovanjem jednokratne Intravenske ili intratumorske injekcije, aktivnosti $0,5 \text{ MBq LuCl}_3 / 0,05 \text{ ml}$. Za ispitivanja su korišćena po tri miša za svaki tip ksenografta i za svaku vremensku tačku (1, 24, 72 i 144 h). Miševi su žrtvovani dislokacijom cervikalnih pršljenova. Organi od interesa su izvađeni i izmerena je njihova radioaktivnost u γ brojaču (Wizzard 2480, Perkin Elmer, SAD).

Dobijeni rezultati prikazani su kao odnos radioaktivnosti datog organa i radioaktivnosti ukupne injektovane doze (radioaktivnost standarda) (%ID).

3.8.4. Terapijska efikasnost $^{177}\text{Lu-DMSA-SMNČ}$

3.8.4.1. Uticaj različitih doza zračenja na terapijsku efikasnost $^{177}\text{Lu-DMSA-SMNČ}$

Na početku eksperimenta, ženke BALB/c miševa sa indukovanim ksenograftima CT-26 i 4T1 tumora, zapremina tumora od 100 do 150 mm^3 , podeljene su nasumično u grupe od po 6 miševa. Za svaki od ovih eksperimentalnih modela tumora (CT-26 i 4T1) formirane su sledeće grupe:

- *pet tretiranih grupa* – koje dobijaju jednokratnu intratumorsku injekciju $^{177}\text{Lu-DMSA-SMNČ}$ ($0,1 \text{ mg DMSA-SMNČ} / 0,05 \text{ ml}$ fiziološkog rastvora) različitih doza radioaktivnosti: 1,85; 3,7; 9,25; 15 i 25 MBq , da bi se ispitao efekat radionuklidne terapije na određenu zapreminu tumora (6 miševa x doza radioaktivnosti).
- *kontrolna grupa* – koja dobija jednokratnu intratumorsku injekciju nanosuspencije DMSA-SMNČ u istoj koncentraciji nanočestica i zapremini rastvarača kao što je injektovano tretiranim grupama ($0,1 \text{ mg DMSA-SMNČ} / 0,05 \text{ ml}$ fiziološkog rastvora).

Tokom trajanja eksperimenta, veličine ksenografta merene su svakog drugog dana i izračunata je njihova zapremina (u mm^3). Na kraju eksperimenta tj. 14. dana, miševi su žrtvovani metodom cervikalne dislokacije, a tumori i organi od interesa (srce, pluća, jetra, slezina, bubrezi) iz svih grupa su izvađeni i izmerena je njihova masa. Nakon toga, organi i tumori su zamrznuti i korišćeni za dalja patohistološka ispitivanja.

3.8.4.2. Ispitivanje toksičnosti $^{177}\text{Lu-DMSA-SMNČ}$

Tokom trajanja eksperimenta, opšte stanje miševa praćeno je svakodnevno vizuelnim pregledom, dok je telesna masa miševa (kao indikator sistemske toksičnosti) merena svakog drugog dana.

3.8.4.3. Uticaj početne veličine ksenografta na efikasnost terapije ^{177}Lu -DMSA-SMNČ

U ovim eksperimentima, koji su imali za cilj procenu uticaja početnih veličina ksenografta na efikasnost terapije 3,7 MBq ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (0,1 mg DMSA-SMNČ/0,05 ml fiziološkog rastvora) nakon jednokratne intratumorske injekcije, ženke BALB/c miševa sa indukovanim ksenograftima i CT-26 i 4T1 tumora su nasumično podeljene u grupe (6 miševa x vrsta tumora x početna veličina tumora). U odnosu na početnu veličinu ksenografta na dan injektovanja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ, miševi su podeljeni u tri grupe:

- grupa 1: miševi sa malom početnom veličinom ksenografta (45-75 mm³),
- grupa 2: miševi sa srednjom početnom veličinom ksenografta (100-150 mm³),
- grupa 3: miševi sa velikom početnom veličinom ksenografta (200-300 mm³).

Za poređenje dobijenih rezultata, kontrolnim grupama miševa je i.t. injektovano 0,1 mg DMSA-SMNČ/0,05 ml fiziološkog rastvora (3 miša x vrsta tumora x početna veličina tumora).

3.9. Patohistološka analiza

Nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja u toku autopsije, makroskopski su identifikovani tumori i pregledani organi od interesa (srce, pluća, jetra, slezina i bubrezi) kako bi se vizuelno utvrdilo prisustvo degenerativnih promena i metastaza na površini organa.

Nakon vađenja iz životinje, organi i tumori su zamrznuti u Tissue-Tec® O.C.T. medijumu i čuvani u zamrzivaču na temperaturi od -80 °C dok radioaktivnost ne opadne ispod nivoa izuzeća (ispod granice detekcije) što za ^{177}Lu sa vremenom poluraspada od 6,7 dana iznosi oko 67 dana (10 vremena poluraspada).

Zamrznuti organi i tumori žrtvovanih miševa sečeni su kriotomom (Kedi Instrumental Equipment, Kina) na preseke debljine 5 µm, a zatim nalepljeni na polarizovane mikroskopske pločice (Superfrost®, Thermo Scientific). Nakon 24 sata sušenja, preseki tkiva na pločicama su bojeni standardnom hematoksilin-eozin (HE) tehnikom koja služi za prikazivanje strukturnih promena na ćelijama i prisustvo nekroze tkiva (176–178). Za kvalitativnu evaluaciju ^{177}Lu -DMSA-SMNČ u tumorskom tkivu, primenjeno je bojenje pruskim plavim (PP) (179)

Svi HE mikroskopski preseki su pregledani na Leica DM LS2 mikroskopu (Leica Microsystems, Nemačka) od strane dva nezavisna iskusna patologa koji nisu bili upoznati sa podacima iz eksperimenta. Konačni rezultati interpretacije promena predstavljaju srednju vrednost nalaza oba patologa. Originalne mikrofotografije uslikane su Canon PowerShot S70 kamerom (uvećanja 100x, 200x i 400x).

Preseki tumorskog tkiva i organa od interesa kvalitativno su interpretirani u odnosu na morfologiju i stepen diferencijacije tumora, kao i na prisustvo metastaza u organima. Patohistološki preparati tumorskog tkiva su interpretirani prema semikvantitativnoj analizi baziranoj na stepenu nekroze i fibroze u odnosu na zapreminu tumora (diskretna - ako je <1/3; umerena - od 1/3 do 2/3; izražena - >2/3 od ukupne zapremine tumora).

3.10. Statistička obrada rezultata

Svi dobijeni rezultati analizirani su pomoću statističkog softvera IBM® SPSS® Statistics, verzija 17.0 (SPSS Inc, Chicago, SAD), a za grafički prikaz podataka korišćeni su programi Microsoft Excell 2007 i Origin®Pro (verzija 8.5). Za proveru normalnosti distribucije podataka korišćen je Shapiro-Wilk test. Parametarski test - jednofaktorska analiza varijansi (engl. One-way Analysis of variance, akronim one-way ANOVA) korišćen je za ispitivanje statistički značajne razlike među dobijenim rezultatima kontrolnih i terapijskih grupa. U slučaju nezavisnih uzoraka, korišćen je neparametarski Mann-Whitney U test.

Rezultati eksperimenata prikazani su kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. U svim slučajevima, dobijena vrednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom razlikom.

Veličina uzorka i snaga studije

Veličina uzorka određena je pomoću statističkog on-line programa G power (180). U obzir su uzete vrednosti α - od 0,05 i snaga studije β od 0,08 za Studentov test (za 2 nezavisna uzorka).

Prema očekivanoj najvećoj razlici parametara koje ispitujeemo između kontrolnih i eksperimentalnih grupa, određen je neophodan broj eksperimentalnih miševa i on je iznosio 6 po grupi.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

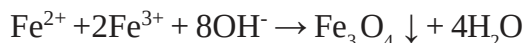
4.1. Sinteza i karakterizacija SMNČ na bazi Fe₃O₄

4.1.1. Sinteza Fe₃O₄ SMNČ metodom koprecipitacije

U literaturi je opisano više različitih metoda sinteze magnetnih nanočestica, od kojih su najznačajnije: hidrotermalna metoda, termalna dekompozicija, sonohemijska, emulzifikaciona metoda, metoda taloženjem iz rastvora (koprecipitacija), sol-gel, sprej piroliza i druge. Svaka metoda poseduje specifičnu proceduru i uslove rada i svaka od njih ima i svoje prednosti, ali i nedostatke. Kao rezultat primene različitih metoda sinteze, dobijaju se nanočestice različitih osobina (oblika, veličine, distribucije veličina, kristalne strukture, magnetnih svojstava, disperzibilnosti itd.) (181).

U ovoj disertaciji, primenjena je metoda sinteze SMNČ na bazi Fe₃O₄ koprecipitacijom Fe²⁺ i Fe³⁺ jona u baznoj sredini koju je pre više od 3 decenije razvio Rene Massart (161,163). Tokom godina, metoda je pretrpela brojne modifikacije. Međutim, u osnovi, hemijska reakcija sinteze SMNČ je ostala ista.

Hemijska reakcija dobijanja magnetita iz odgovarajućih prekursorskih jona se može prikazati na sledeći način:



Za postizanje bazne sredine korišćen je rastvor amonijaka (25% NH₃ u H₂O). U baznoj sredini, pri pH vrednostima od 8 do 14 (163) dolazi do formiranja Fe²⁺ i Fe³⁺ hidroksida, koji zatim, na povišenoj temperaturi (50 °C do 60 °C), formiraju magnetit (Fe₃O₄) u vidu taloga crne boje. Pod ovim uslovima, prvo dolazi do formiranja centara nukleacije oko kojih se dalje formiraju kristali magnetita (tzv. *faza nukleacije*). Nakon faze nukleacije, kako bi došlo do tzv. *faze rasta kristala*, smeša se ostavi na povišenoj temperaturi (50 °C do 60 °C) narednih 60 minuta. S obzirom da je magnetit jako osetljiv na oksidaciju, reakcija se izvodi u struji inertnog gasa (azota). Na taj način se sprečava, odnosno umanjuje mogućnost formiranja maghemita (Fe₂O₃ minerala braon boje, koji u svojoj strukturi sadrži samo Fe³⁺ jone).

Na osnovu prikazane reakcije, do potpunog taloženja Fe₃O₄ dolazi pri molском odnosu Fe²⁺ i Fe³⁺ jona od 1:2 i pri pH vrednosti u opsegu od 8 do 14.



Slika 18. Sintetisane SMNČ na bazi Fe₃O₄

Očekivana teorijska masa sintetisanog magnetita metodom koprecipitacije iznosi:

$$\text{Fe}_3\text{O}_4: 0,00337 \text{ mol} \times 231,55 \text{ g/mol} = 0,781 \text{ g (781 mg)}$$

Metodom koprecipitacije je sintetisano 510 mg Fe_3O_4 , tako da prinos reakcije iznosi ~ 65%, što ovu metodu svrstava u pogodnu metodu za sintezu SMNČ na bazi Fe_3O_4 . Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima (182,183). Osim toga, ova metoda je jednostavna, brza i ekonomski isplativa. Osnovni nedostatak ovog postupka sinteze je nemogućnost kontrolisane sinteze nanočestica odgovarajuće veličine i oblika. Pošto morfologija i veličina pripremljenih nanočestica kao i njihova uniformnost (visoka PDI vrednost) veoma zavise od reakcionih uslova, neophodno je odabrati vrstu soli gvožđa za sintezu (hloridi, sulfati, nitrati i dr.) i kontrolisati parametre sinteze, kao što su koncentracija polaznih soli u rastvoru, jonska jačina rastvora, temperatura, pH i brzina mešanja, jer oni znatno utiču na rast kristala i pojavu agregata (184).

Da bi se ispitao uticaj reakcionih uslova na morfologiju, veličinu i uniformnost SMNČ, sinteza SMNČ je izvedena i modifikovanjem ove osnovne metode. Jedna od modifikacija je primena kiselinskog postupka u završnoj obradi precipitata, koja se primenjuje u cilju povećanja prinosa i dodatnog prečišćavanja dobijenog taloga magnetita. U drugoj modifikaciji sinteze koprecipitacijom, u cilju dobijanja čestica što manjih dimenzija, sa značajnije uređenom kristalnom strukturom, korišćeno je izlaganje dobijenog taloga magnetita dejstvu mikrotalasnog polja u završnom postupku (185). Osnovne prednosti primene mikrotalasa su velika brzina grejanja i uniformnost prenosa toplote.

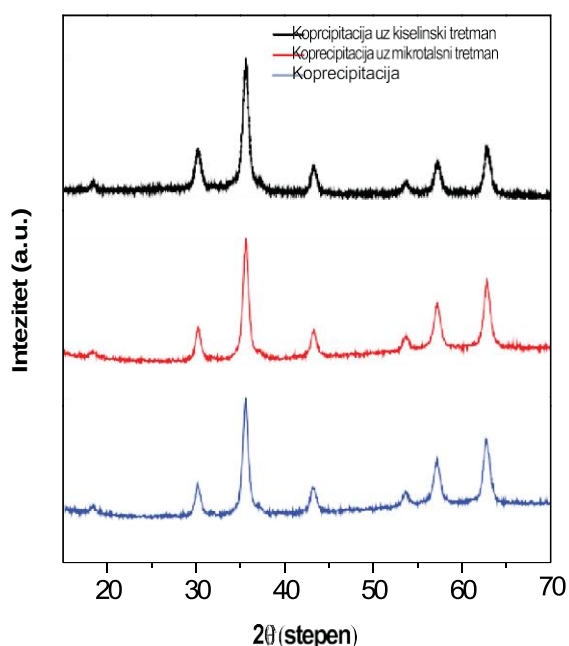
4.1.2. Karakterizacija dobijenih SMNČ na bazi Fe_3O_4

Analiza strukturnih i mikrostrukturnih osobina SMNČ urađena je primenom metoda: rendgenske difrakcije na prahu (XRPD) i transmisione elektronske mikroskopije (TEM).

4.1.2.1. Karakterizacija metodom XRPD

Kristalna struktura sintetisanih neobloženih SMNČ ispitana je metodom rendgenske difrakcije na prahu (XRPD). Difraktogrami za SMNČ dobijenih primenom tri opisana postupka sinteze prikazani su na slici 19.

Analizom difraktograma za sva tri uzorka primećuje se da dobijeni talozi pripadaju spinelnom tipu strukture, bez prisustva nekih drugih mogućih faza. Karakteristične refleksije spinelne strukture (220) i (311), odgovaraju refleksiji maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (JCPDS # 110614) i magnetita (Fe_3O_4) (JCPDS # 19-0629). Analizom dobijenih rezultata, možemo zaključiti da su sintetisane SMNČ verovatno smeša dve faze, magnetita i maghemita (186). Izraženo crna boja taloga sugerše da je magnetit dominantan sastojak sintetisanih smeša jedinjenja. Srednja veličina kristalita (d_{XRD}), određena pomoću Šererove jednačine (187) iznosila je 12,2 nm što je u skladu sa prečnicima čestica dobijenih pomoću TEM metode.

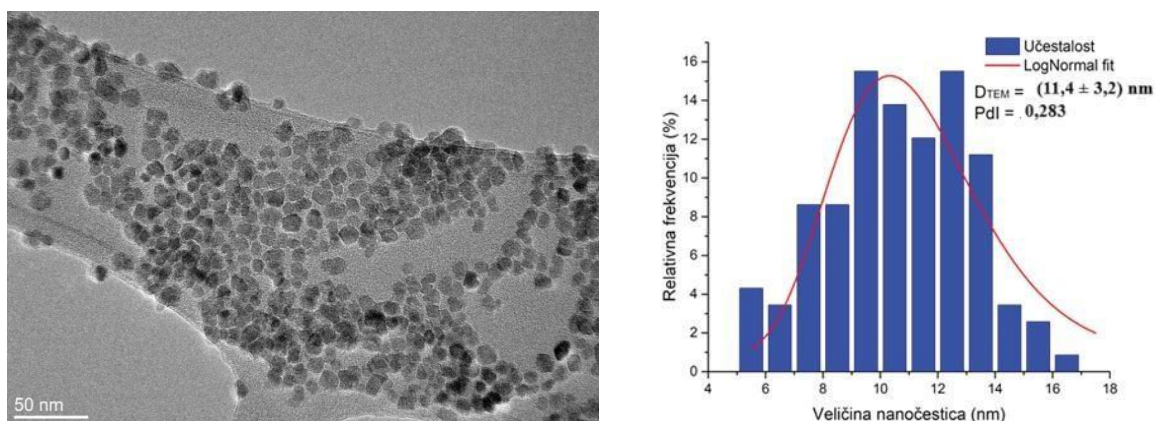


Slika 19. Difraktogrami neobloženih SMNČ

4.1.2.2. Karakterizacija metodom transmisije elektronske mikroskopije

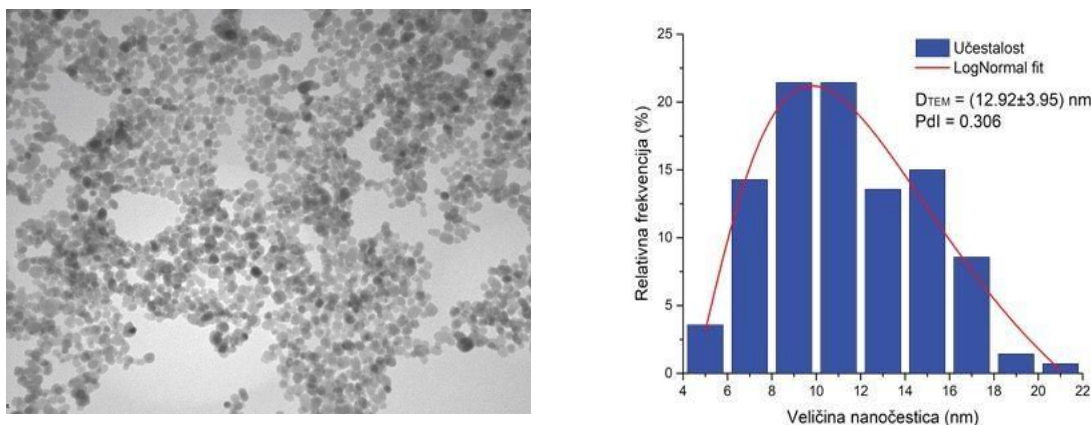
Metodom transmisije elektronske mikroskopije (TEM) ispitani su oblik i veličina SMNČ sintetisanih primenom tri opisana postupka sinteze. Dobijene TEM mikrografije uzoraka prikazane su na slikama 20-22. Za svaki od uzoraka analizirano je oko 350 čestica u cilju utvrđivanja njihove distribucije po veličini.

Na osnovu prikazanih mikrografija, zaključujemo da su neobložene SMNČ dobijene metodom koprecipitacije pretežno oblika sfere (pseudosfere). Prosečna veličina prečnika čestica dobijenih metodom koprecipitacije je 11,4 nm. Izmereni indeks polidisperznosti je oko 28%, što je u skladu sa rezultatima za metodu koprecipitacije kod koje je polidisperznost uzoraka obično oko 25-30% (slika 20) (188).



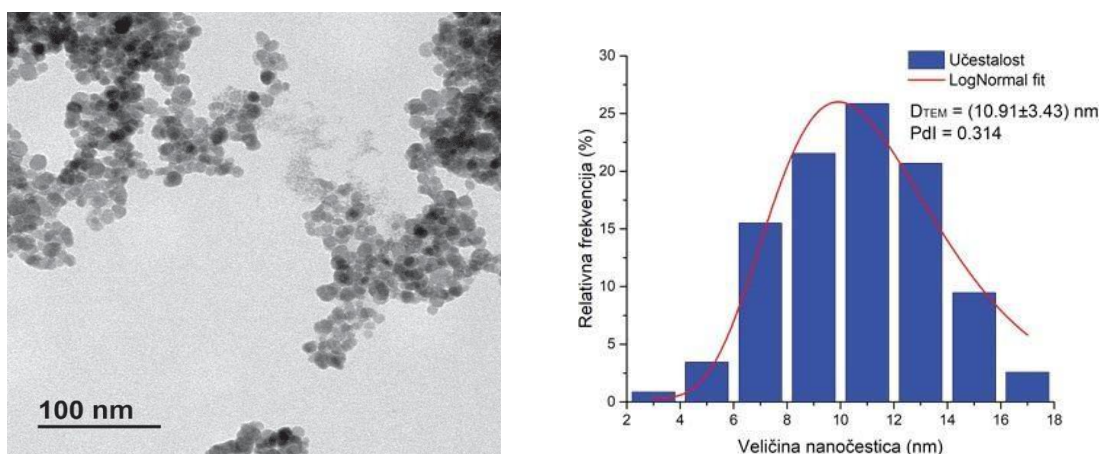
Slika 20. TEM mikrografija neobloženih SMNČ sintetisanih metodom koprecipitacije sa prikazanom distribucijom čestica po veličini

Prosečna veličina prečnika čestica dobijenih metodom koprecipitacije praćenom kiselinskim postupkom u završnoj obradi precipitata, iznosi 12,9 nm, dok je Pdl vrednost 30,6% (Slika 21).



Slika 21. TEM mikrografija neobloženih SMNČ sintetisanih metodom koprecipitacije praćenoj kiselinskim postupkom u završnoj obradi precipitata

Prosečna veličina prečnika čestica dobijenih metodom koprecipitacije praćenoj mikrotalasnim završnim tretmanom iznosi 10,9 nm, dok je PdI vrednost 31,4% (Slika 22).



Slika 22. SMNČ dobijene metodom koprecipitacije sa mikrotalasnim završnim tretmanom

Sa prikazanih slika se može uočiti da čestice imaju tendenciju ka agregaciji. Ovo se objašnjava činjenicom da dobijene čestice nanometarskih dimenzija imaju hidrofobnu površinu, sa velikim odnosom površine prema zapremini čestica, što za posledicu ima veliku površinsku energiju.

Na osnovu rezultata dobijenih TEM metodom, zaključujemo da primena različitih modifikacija sinteze koprecipitacijom nije dovela do značajnih razlika u prosečnoj veličini sintetisanih nanočestica. Naprotiv, klasičnim koprecipitacionim postupkom dobijene su čestice manjeg prečnika i ujednačenijih veličina (na šta ukazuje dobijena manja PdI vrednost).

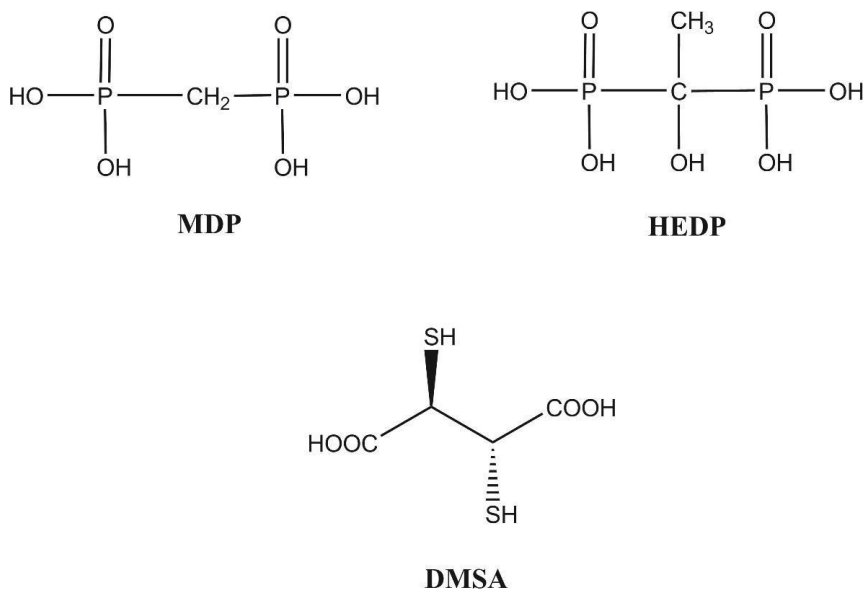
Iz pomenutih razloga, kao i usled činjenice da primenjene dve modifikacije sinteze imaju duži i složeniji postupak, kao i primenu specijalne opreme (mikrotalasna pećnica), odlučeno je da se dalja istraživanja nastave sa SMNČ dobijenim metodom koprecipitacije bez modifikacija.

Metodom koprecipitacije sintetisane su relativno uniformne SMNČ povoljnih fizičko-hemijskih osobina, pogodnih za dalju površinsku modifikaciju.

4.2. Funkcionalizacija SMNČ

Nanočestice sintetisane metodom koprecipitacije imaju veliku specifičnu površinu koja dovodi do intenzivne težnje ka agregaciji. Kako je stabilizacija magnetnih nanočestica u suspenziji od ključnog značaja za njihovu primenu, potrebno je održavati međusobno rastojanje između čestica iznad kritične vrednosti pri kojoj dolazi do agregacije. To se može postići funkcionalizacijom površine čestica odgovarajućom oblogom. Različita jedinjenja, kao što su silani (189) (1/1, fosfonati (190), hidrofilni polimeri (polietilen glikol (PEG), polietilen oksid (PEO)) (109), albumin (191), dekstran (191) i sl. se koriste za njihovo oblaganje. Obložene SMNČ mogu uspešno vezati različite agense (192) i radionuklide za nanočesticu.

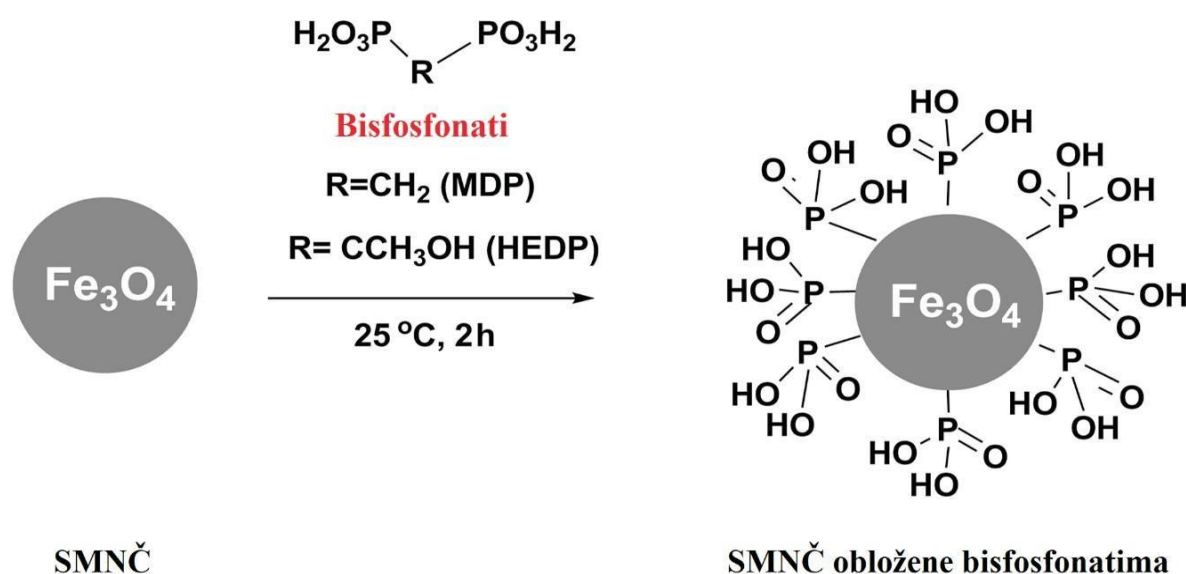
Zbog svoje biokompatibilnosti i dostupnosti koja ih čini pogodnim oblogama za funkcionalizaciju nanočestica, u ovoj disertaciji korišćena su tri jedinjenja: metilendifosfonska kiselina (MDP), 1- hidroksi etiliden-1,1-difosfonska kiselina (HEDP) i mezo-2,3-dimerkaptoćilbarna kiselina (DMSA). Njihove strukturne formule prikazane su na slici 23.



Slika 23. Strukture MDP, HEDP i DMSA

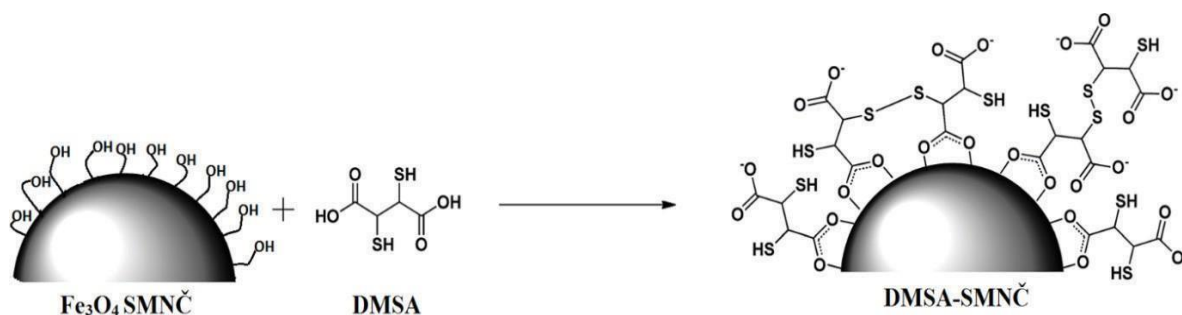
Ova jedinjenja obeležena $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se više decenija upotrebljavaju u nuklearnoj medicini, u dijagnostičkim procedurama. Za scintigrafiju skeleta najčešće se koriste bisfosfonati obeleženi tehnecijumom-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP), dok se statička scintigrafija bubrega izvodi korišćenjem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA, koji zbog izraženog afiniteta prema ćelijama proksimalnog tubula omogućava procenu funkcionalne kortikalne mase bubrega (94).

Fosfonati sadrže jednu ili više R-PO(OH)_2 ili C-PO(OR)_2 (gde je R = alkil, aril) grupa. Fosfonatna grupa sadrži tri atoma kiseonika - jedan iz fosforil grupe (P=O) i dva iz hidroksilne grupe (P-OH) (193). S obzirom da se do tri atoma kiseonika mogu vezati za površinu SMNČ, načini vezivanja fosfonata za površinu metalnih oksida mogu biti mono- bi- ili tri-dentatni (194). Prilikom vezivanja atoma kiseonika iz fosfonata za različite atome na površini SMNČ gradi se bidentatna ili tridentatna veza. Vezivanjem dva ili tri atoma kiseonika iz fosfonata za atom metala gradi se kovalentna veza. Shematski prikaz funkcionalizacije SMNČ bisfosfonatima dat je na slici 24.



Slika 24: Shematski prikaz funkcionalizacije SMNČ bisfosfonatima

Kod nanočestica na bazi Fe_3O_4 , molekuli DMSA su vezani simetrično za površinu nanočestica magnetita preko atoma kiseonika, a $\text{Fe}-\text{O}-\text{C}$ veza je slična polarnoj kovalentnoj vezi. Pri funkcionalizaciji površine nanočestice sa DMSA, slobodne tiolne grupe iz susjednih vezanih molekula su bliže jedna drugoj, čineći da je formiranje disulfidnih ($-\text{S}-\text{S}-$) mostova unutar čestica dominantan mehanizam, kojim se sprečava agregacija čestica i samim tim dolazi do veće stabilnosti u rastvorima. Osim toga, postoji mogućnost građenja međučestičnih $\text{S}-\text{S}$ mostova što rezultuje povećanjem agregacije čestica, što ima za posledicu visoke vrednosti hidrodinamičkih prečnika. Dostupnost $-\text{SH}$ (tiolnih) i $-\text{COOH}$ (karboksilnih) grupa pruža više mogućnosti u vezivanju biološki aktivnih molekula kao i radionuklida za funkcionalizovane nanočestice (195). Shematski prikaz funkcionalizacije SMNČ sa DMSA, dat je na slici 25.



Slika 25: Shematski prikaz funkcionalizacije SMNČ sa DMSA (196)

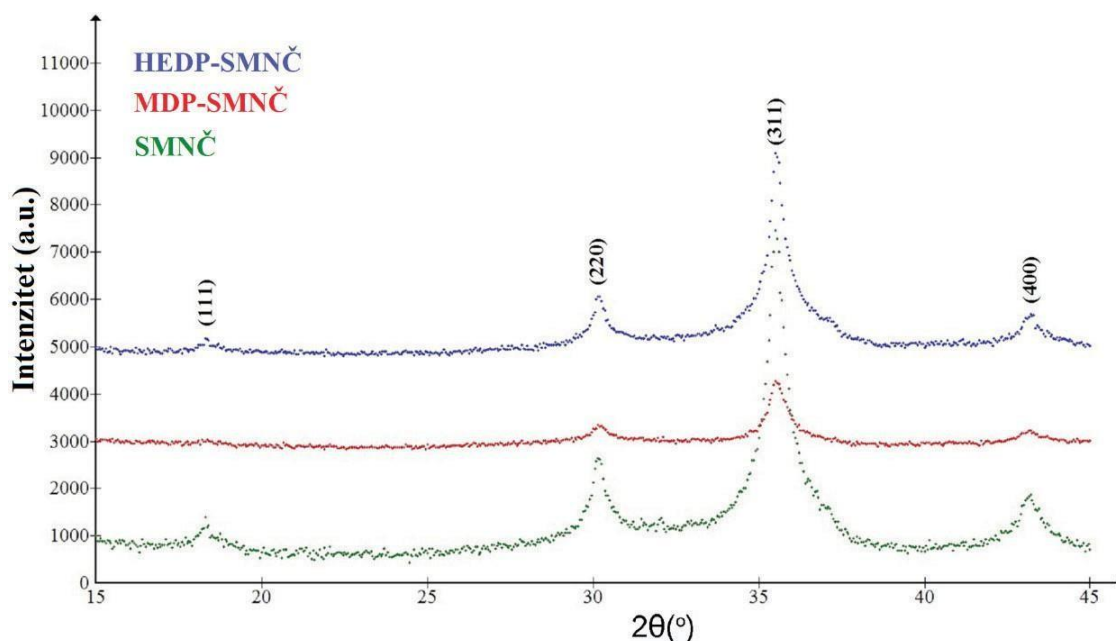
4.3. Karakterizacija obloženih SMNČ

4.3.1. Karakterizacija SMNČ obloženih bisfosfonatima (MDP i HEDP)

4.3.1.1. Karakterizacija MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ metodom XRPD

Kristalna struktura sintetisanih MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ ispitana je metodom rendgenske difrakcije na prahu (XRPD). Difraktogrami su prikazani na slici 26.

Analizom difraktograma za sva tri uzorka primećuje se da dobijeni talozi pripadaju spinelnom tipu strukture, bez prisustva nekih drugih mogućih faza. Karakteristične refleksije spinelne strukture (220) i (311), odgovaraju refleksiji maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (JCPDS # 110614) i magnetita (Fe_3O_4) (JCPDS # 19-0629). Analizom dobijenih rezultata, možemo zaključiti da su sintetisane SMNČ verovatno smeša dve faze, magnetita i maghemita (186). Izraženo crna boja taloga sugerise da je magnetit predominantan sastojak sintetisanih smeša jedinjenja. Srednja veličina kristalita (d_{XRD}), određena pomoću Šererove jednačine (187) iznosila je 12,2 nm što je u skladu sa prečnicima čestica dobijenih pomoću TEM metode. Iz prikazanih difraktograma se može zaključiti da postupak funkcionalizacije nije imao uticaja na kristalnu strukturu sintetisanih SMNČ



Slika 26. Difraktogrami neobloženih i obloženih SMNČ

4.3.1.2. Karakterizacija MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ metodom DLS

Veličine čestica SMNČ obloženih bisfosfonatima, određena je DLS metodom. Ovom metodom određuje se veličina čestica zajedno sa hidrodinamičkim slojem, tako da je dobijena veličina veća u odnosu na onu koja se dobija pomoću TEM merenja. D_H predstavlja hidrodinamički prečnik sfere (tj. prečnik čestice sa hidrodinamičkim slojem) koji ima istu zapreminu kao čestica i predstavlja srednju vrednost prečnika svih merenih čestica (197).

Srednje vrednosti hidrodinamičkih prečnika dobijenih DLS metodom za SMNČ, MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ, prikazane su u tabeli 4.

Zbog nestabilnosti neobloženih SMNČ na pH 6, nije bilo moguće odrediti njihov hidrodinamički prečnik. Vrednosti hidrodinamičkih prečnika čestica za nanosuspenzije MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ iznose 45,6 nm, odnosno 51,9 nm. Razlika u prečniku SMNČ dobijenom TEM i DLS metodama posledica je toga da vrednost D_H (kod DLS) uključuje veličinu čestica u hidratisanom stanju, zajedno sa molekulima bisfosfonata koji oblažu površinu čestice, čineći omotač oko čestice značajno većim od veličine same čestice. Za razliku od DLS-a, bisfosfonatni lanci se ne mogu videti mikroskopskim metodama usled slabog kontrasta u odnosu na signal pozadine, kao posledica niske gustine elektrona. Dobijeni rezultati ukazuju na vezivanje MDP i HEDP-a za površinu sintetisanih SMNČ.

Tabela 4. Srednje vrednosti prečnika SMNČ dobijenih TEM i DLS metodom

Metoda	SMNČ	MDP-SMNČ	HEDP-SMNČ
TEM	11,4 ± 3,2 nm	11,4 ± 3,2 nm	11,4 ± 3,2 nm
DLS	-	45,6 ± 2,1 nm	51,9 ± 2,4 nm

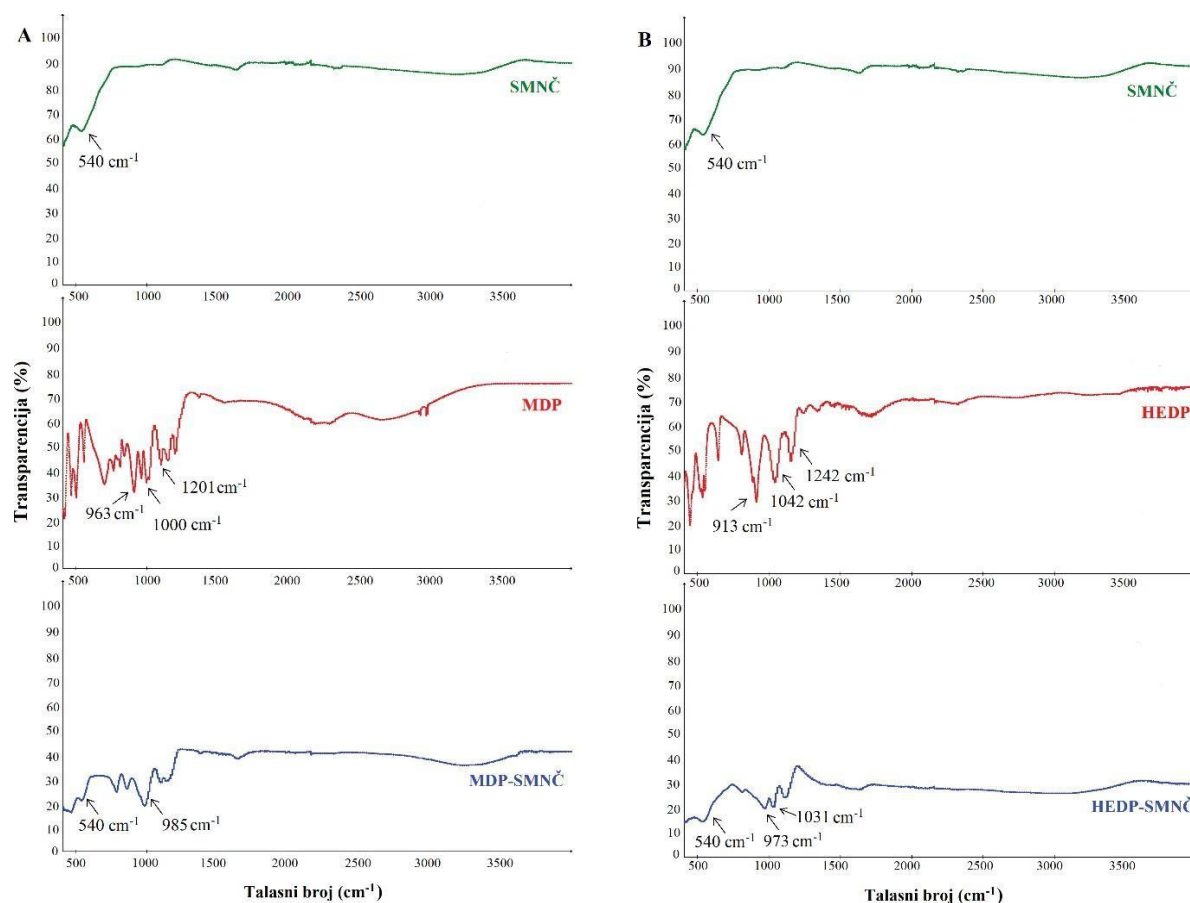
4.3.1.3. Određivanje zeta potencijala MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ

Dispergovane čestice se smatraju stabilnim ako je apsolutna vrednost zeta potencijala čestica veća od 30 mV. U suprotnom, postoji mogućnost da dođe do agregacije (198).

Merenjem zeta potencijala nanosuspenzija neobloženih i obloženih SMNČ na pH 6-7, određeno je površinsko naelektrisanje SMNČ. Kako je vrednost zeta potencijala sintetisanih neobloženih SMNČ iznosila +12,5 mV, vezivanjem bisfosfonata za njihovu površinu, dolazi do promene naelektrisanja na površini čestica. Zahvaljujući prisustvu hidroksilnih i fosfonatnih grupa na površini SMNČ-a koje potiču od obloga, značajno je povećano negativno površinsko naelektrisanje SMNČ. Na pH 7, vrednost zeta potencijala vodenih nanosuspenzija MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ iznosi -47,4 mV i -49,7 mV, što ukazuje da primenjene obloge doprinose stabilizaciji čestica. Slični rezultati opisani su u literaturi (199).

4.3.1.4. Karakterizacija MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ metodom FTIR

Uzorci SMNČ pre i nakon funkcionalizacije sa MDP i HEDP okarakterisani su FTIR spektroskopijom u oblasti od 400 do 4000 cm^{-1} . Takođe, izvršena je karakterizacija samih jedinjenja koja su korišćena za funkcionalizaciju (MDP i HEDP). Dobijeni FTIR spektri prikazani su na slici 27.



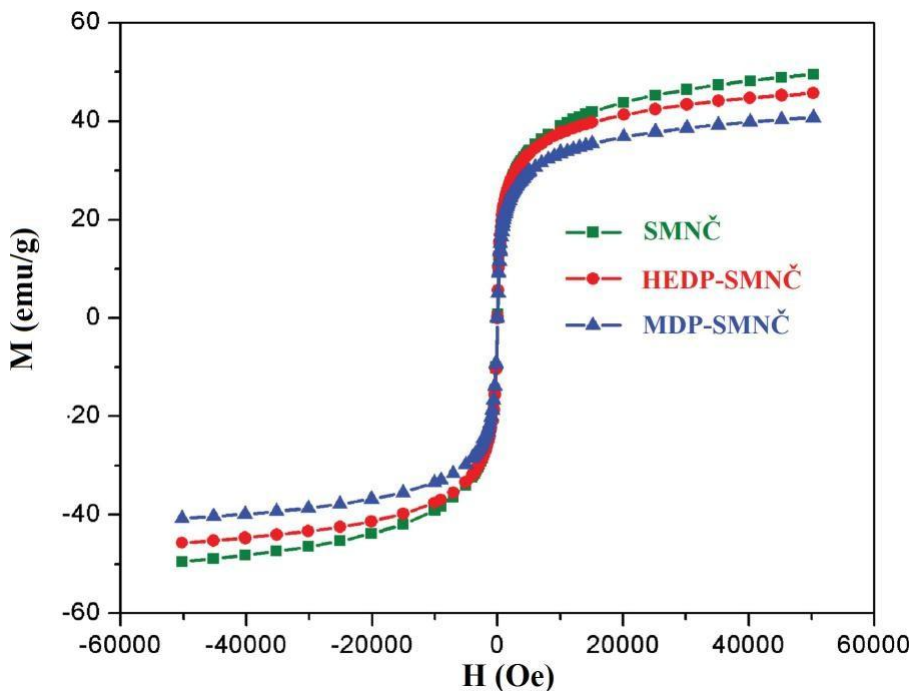
Slika 27. FTIR spektri SMNČ, MDP, HEDP i funkcionalizovanih SMNČ.

Na FTIR spektrima SMNČ na bazi Fe_3O_4 (slika 27) uočava se apsorpciona traka na 540 cm^{-1} koja potiče od vibracije istezanja Fe-O veze i koja potvrđuje prisustvo Fe_3O_4 . FTIR spektar MDP-a karakteriše apsorpciona traka na 1201 cm^{-1} koja odgovara vibracijama istezanja P=O veze, kao i dve apsorpcione trake jakog intenziteta na 1000 cm^{-1} i 963 cm^{-1} koje potiču od asimetričnih (ν_{asym} P–OH) i simetričnih (ν_{sym} P–OH) vibracija istezanja (200,201). U spektru MDP-SMNČ uočava se prisustvo samo jedne široke apsorpcione trake jakog intenziteta na 985 cm^{-1} koja potiče od vibracija savijanja P-O veze. Nestanak tri apsorpcione trake u spektru MDP-SMNČ u odnosu na spektar MDP i prisustvo samo jedne široke apsorpcione trake jakog intenziteta na 985 cm^{-1} jasno ukazuje na vezivanje MDP za površinu SMNČ.

U FTIR spektru jedinjenja HEDP uočava se apsorpciona traka na 1242 cm^{-1} koja odgovara vibracijama istezanja P=O grupe, kao i apsorpcione trake na 1042 cm^{-1} i 913 cm^{-1} koje potiču od asimetričnih i simetričnih vibracija istezanja P–OH veze. Apсорpciona traka na 1242 cm^{-1} koja odgovara vibracijama istezanja P=O grupe u spektru HEDP, ne uočava se u spektru HEDP-SMNČ. Takođe, u spektru HEDP-SMNČ nakon funkcionalizacije primećeno je pomeranje traka, koje potiču od asimetričnih i simetričnih vibracija istezanja P–OH veza kod HEDP-a (1042 cm^{-1} i 913 cm^{-1}), ka nižim vrednostima talasnog broja (1031 cm^{-1} i 973 cm^{-1}). Nestanak trake i pomeranje traka ka nižim vrednostima talasnog broja jasno ukazuje na vezivanje HEDP-a za površinu Fe_3O_4 u uzorcima funkcionalizovanih SMNČ.

4.3.1.5. Magnetna svojstva MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ

Magnetna svojstva sintetisanih SMNČ, kao i funkcionalizovanih SMNČ (MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ) ispitana su pomoću SQUID magnetometra. Zavisnost izotermalne magnetizacije od primenjenog magnetnog polja (histerezijske krive) za ispitivane uzorke, merena je na konstantnoj temperaturi od 300 K, u opsegu jačine magnetnog polja od -5 T do +5 T. Rezultati merenja prikazani su na slici 28.



Slika 28. Histerezijske krive na temperaturi $T=300$ K za SMNČ, MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ

$M(H)$ krive za sva tri uzorka su pokazale da je na temperaturi 300 K koercitivno polje (H_c) i vrednost remanentne magnetizacije (M_r) blizu nule, što ukazuje da su čestice superparamagnetne za vremensku skalu reda sekundi.

Saturaciona magnetizacija (M_s), određena ekstrapolacijom $M(1/H)$ na $H=0$, iznosi 50,1 emu/g za neobložene SMNČ. U slučaju obloženih SMNČ, magnituda magnetizacije je nešto niža, 41,6 emu/g za MDP-SMNČ i 46,9 emu/g za HEDP-SMNČ, zbog adsorbovanog nemagnetnog bisfosfonatnog sloja koji se nalazi na površini SMNČ. Pretpostavlja se i da je ovaj efekat uzrokovan magnetnim poremećajem koji postoji na površini SMNČ usled efekta interakcija spoljašnjih medija (tj. interakcije između čestica). Takođe, nije isključena oksidacija SMNČ tokom procesa oblaganja, što dovodi do formiranja nekih nemagnetnih Fe-oksida (202).

Površina nanočestičnih materijala ima veoma značajan efekat na njihove magnetne osobine. Magnetni joni na površini Fe_3O_4 slabije intereaguju međusobno i stvaraju manje nezasićenih i koordinacionih veza, u odnosu na jone koji se nalaze u jezgru, zbog čega dolazi do nepotpune orijentacije njihovih magnetnih momenata u smeru primenjenog spoljašnjeg magnetnog polja. Takođe, što je nanočestica manja, veći je odnos broja atoma na površini u odnosu na zapreminu. Zbog toga je saturaciona magnetizacija niža (79). Osim uticaja veličine i distribucija veličine čestica utiče na vrednost saturacione magnetizacije. Dokazano je da neujednačena distribucija veličine čestica negativno utiče na magnetna svojstva zbog statistike čestične orijentacije. Prema literaturnim podacima SMNČ sintetisane

metodom koprecipitacije imaju manju saturacionu magnetizaciju u odnosu na SMNČ dobijene drugim metodama (poliol) (203).

4.3.1.6. Magnetna hipertermija MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ

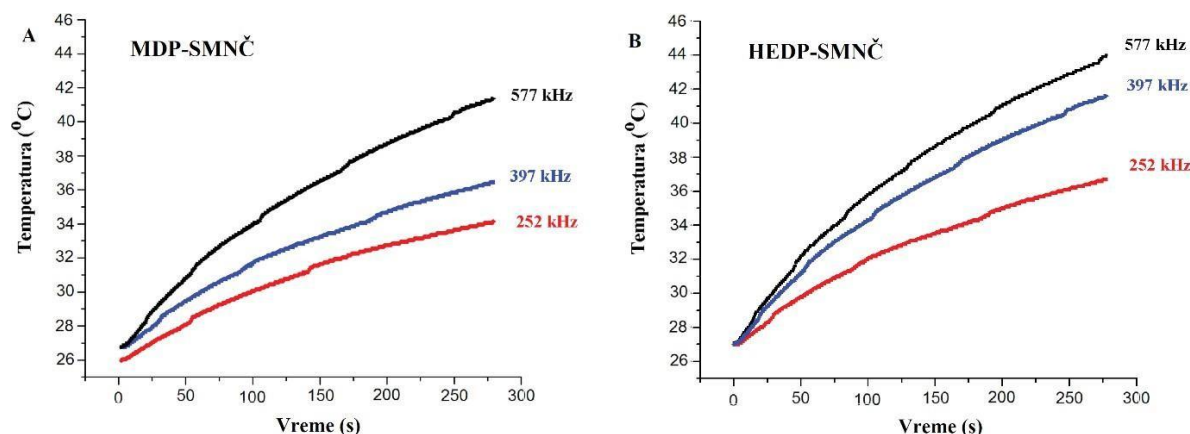
S obzirom da je jedan od ciljeva ove disertacije sinteza SMNČ koje će postići odgovarajuće zagrevanje pod uticajem spoljašnjeg magnetnog polja, čime bi bila omogućena njihova potencijalna teranostička primena, određivanje vrednosti specifične brzine apsorpcije (SAR) predstavlja važan parameter u njihovoj karakterizaciji. Efikasnost grejanja SMNČ predstavlja efikasnost pretvaranja energije magnetnog polja u toplotu i procenjuje se preko SAR vrednosti. Pretvaranje energije magnetnog polja u toplotu zavisi ne samo od parametara magnetnog polja već i od veličine, raspodele veličine, oblika, hemijskog sastava i kristalne strukture čestica. Izbor jedinjenja za oblaganje je takođe jedan od parametara koji utiče na efikasnost grejanja nanočestica jer debljina obloge, a samim tim i veličina obložene nanočestice utiče na vrednost specifične brzine apsorpcije (204,205).

Kinetičke krive grejanja MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ izmerene su u spoljašnjem promenljivom magnetnom polju jačine $H = 23,9$ kA/m i frekvencijama od 252 kHz, 397 kHz i 577 kHz, koristeći komercijalni uređaj DM100 serije. Da bi se ispitao uticaj različitih površinskih obloga na sposobnost zagrevanja okoline od strane SMNČ, izračunate su SAR vrednosti i prikazane u tabeli 5. Izlaganjem u promenljivom magnetnom polju jačine 23,9 kA/m i frekvencije od 577 kHz, za HEDP-SMNČ, dobijena je vrednost SAR od 141,4 W/g, dok je za MDP-SMNČ vrednost bila nešto niža (113,3 W/g). SAR vrednost za neobložene SMNČ nije određivana iz razloga nestabilnosti samog uzorka u vodenoj sredini.

Tabela 5. SAR vrednosti vodenih nanosuspenzija SMNČ u promenljivom magnetnom polju jačine 23,9 kA/m pri različitim frekvencijama

	SAR (W/g)		
	252 kHz	397 kHz	577 kHz
MDP-SMNČ	37,3	63,2	113,3
HEDP-SMNČ	65,5	88,5	141,4

Zavisnosti promene temperature vodenih nanosuspenzija MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ u funkciji vremena izlaganja pri konstantnoj jačini spoljašnjeg promenljivog magnetnog polja od 23,9 kA/m i različitim frekvencijama, prikazane su na slici 29. Dokazano je da HEDP-SMNČ postizu temperaturu od 42 °C na 397 KHz, dok MDP-SMNČ postizu temperaturu od 41 °C na 577 KHz kada su izložene konstantnoj jačini magnetnog polja i istom vremenu izlaganja.



Slika 29. Temperaturni profili za MDP-SMNČ (A) i HEDP-SMNČ (B) kada su izložene konstantnoj jačini spoljašnjeg promenljivog magnetnog polja od 23.9 kA/m i frekvencijama od 252 kHz, 397 kHz i 577 kHz.

U kliničkoj primeni magnetne hipertermije treba imati u vidu i fiziološka ograničenja, kada su u pitanju spoljašnji parametri (frekvencija i jačina primenjenog polja), jer magnetno polje visokih frekvencija može izazvati lokalno zagrevanje u delu tkiva u kome se ne nalaze magnetne čestice usled pojave vrtložnih struja. Dozvoljena frekvencija i amplituda polja koje se mogu smatrati bezbednim za kliničku upotrebu još uvek nisu uspostavljene. Atkinson i Brezovich (206) su preporučili da su frekvencija od 50 kHz do 1 MHz i jačina spoljašnjeg magnetnog polja <15 kA/m gornje dozvoljene granice koje se mogu primeniti na ljudima. Eksperimentalno izračunata maksimalna dozvoljena vrednost za proizvod $H \cdot f$ koji se može primeniti na ljudima iznosi $4,85 \cdot 10^8$ A/m·s (206), dok je kasnije ustanovljen i Herg-tov limit od $5 \cdot 10^9$ A/m·s (207). Ove činjenice su dovele do preovlađujućeg stava da se gornja granica proizvoda $H \cdot f$ može pomeriti ka većim vrednostima u slučaju kraćih vremenskih perioda primene, manjih površina koje se tretiraju i u zavisnosti od ozbiljnosti bolesti, veličine tumora i njegove dostupnosti.

Osim kliničkih, potrebno je posebno obratiti pažnju i na tehnička ograničenja uređaja za magnetnu hipertermiju, jer je većina istraživanja uticaja hipertermije na biološka tkiva urađena u veoma uskom opsegu primenjenih frekvencija i polja. Zbog toga, parametri magnetnog polja moraju biti precizno određeni kako bi se optimizovala efikasnost grejanja SMNČ, bilo da se koriste za specifično lokalno oslobađanje leka ili kao terapijski agensi same po sebi, izazivanjem citolize tumorskih ćelija, za koje je karakteristično da su osetljivije na povišenu temperaturu od zdravih ćelija (208,209).

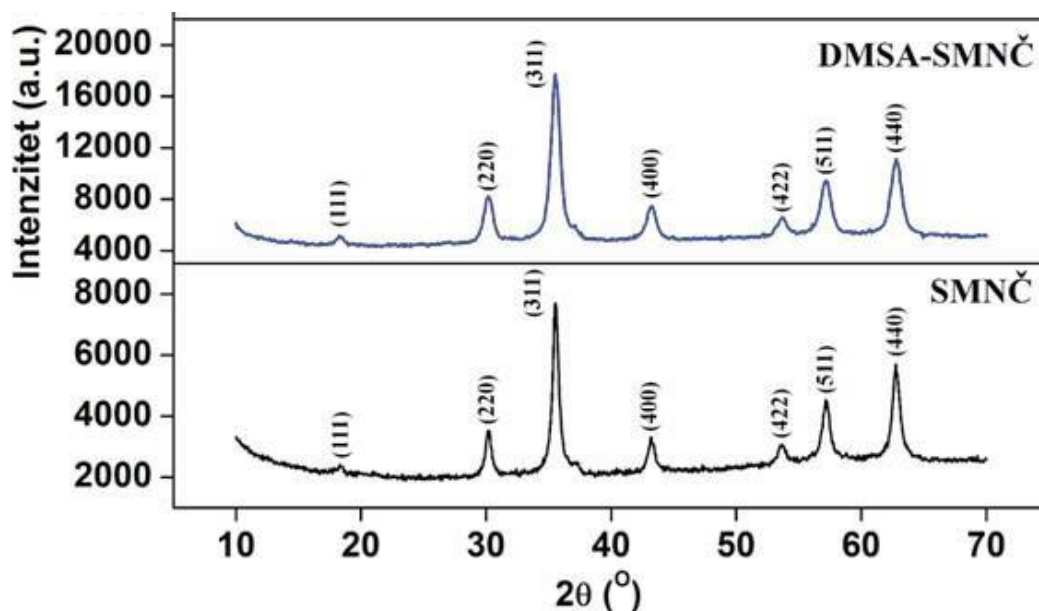
Poredeći publikovane SAR vrednosti za SMNČ na bazi gvožđa (koje se kreću u intervalu od 10–300 W/g) sa dobijenim SAR vrednostima SMNČ obloženih bisfosfonatima, možemo zaključiti da sintetisane MDP-SMNČ i HEDP-SMNČ pokazuju obećavajuću efikasnost grejanja pod uticajem spoljašnjeg magnetnog polja, pa se mogu koristiti u daljim *in vitro* / *in vivo* istraživanjima.

4.3.2. Karakterizacija SMNČ obloženih sa DMSA

4.3.2.1. Karakterizacija DMSA-SMNČ metodom XRPD

Kristalna struktura sintetisanog DMSA-SMNČ ispitana je metodom rendgenske difrakcije na prahu (XRPD). Difraktogrami za neobložene SMNČ i DMSA-SMNČ prikazani su na slici 30.

Analizom difraktograma primećuje se da dobijeni talozi pripadaju spinelnom tipu strukture, bez prisustva nekih drugih mogućih faza. Karakteristične refleksije spinelne strukture (220) i (311), odgovaraju refleksiji maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (JCPDS # 110614) i magnetita (Fe_3O_4) (JCPDS # 19-0629). Analizom dobijenih rezultata, zaključuje se da su sintetisane SMNČ verovatno smeša dve faze, magnetita i maghemita (186). Izraženo crna boja taloga sugerise da je magnetit dominantan sastojak sintetisanih smeša jedinjenja. Srednja veličina kristalita (d_{XRD}), određena pomoću Šererove jednačine (187) iznosila je 12,2 nm što je u skladu sa prečnicima čestica dobijenih pomoću TEM metode. Iz prikazanih difraktograma se može zaključiti da postupak funkcionalizacije nije imao uticaja na kristalnu strukturu sintetisanih SMNČ.



Slika 30. Difraktogrami neobloženih i obloženih SMNČ

4.3.2.2. Karakterizacija DMSA-SMNČ metodom DLS

Vrednost hidrodinamičkog prečnika obloženih DMSA-SMNČ određena je DLS metodom i iznosi $140,3 \pm 6,5$ nm. Ovo povećanje prečnika u odnosu na dijametar neobložene čestice (dobijen pomoću TEM) od 11 ± 3 nm je posledica prisustva hidratisanog sloja na površini nanočestica. Takođe, obložene SMNČ su znatno većeg prečnika od neobloženih što ukazuje na vezivanje DMSA za površinu sintetisanih SMNČ.

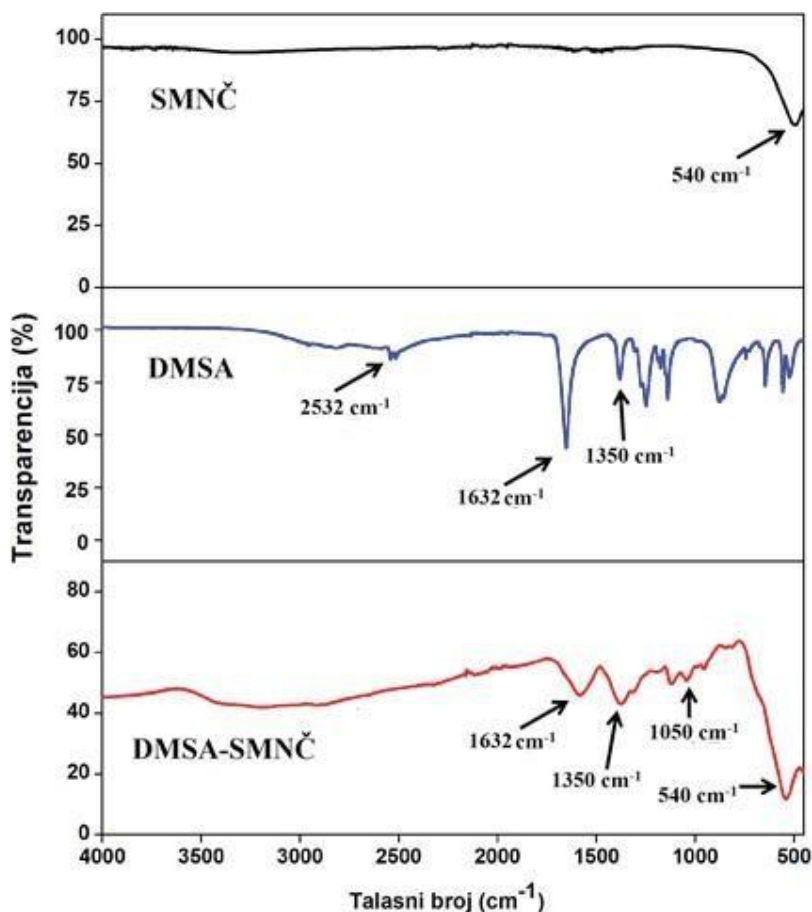
4.3.2.3. Određivanje zeta potencijala DMSA-SMNČ

Merenjem zeta potencijala vodenih nanosuspenzija neobloženih i obloženih SMNČ na pH 7, određeno je površinsko naelektrisanje SMNČ. Zeta potencijal neobloženih SMNČ je iznosio +12,5 mV. Oblaganje površine SMNČ sa DMSA je značajno uticalo na

površinsko naelektrisanje. Na pH 7, zeta potencijal vodenih nanosuspenzija DMSA-SMNČ je negativan i iznosi $-35,1$ mV, što ukazuje da je došlo do elektrostatičke stabilizacije SMNČ nakon oblaganja odn. povećanja stabilnosti SMNČ. Visoka negativna vrednost zeta potencijala za DMSA-SMNČ u odnosu na neobložene SMNČ, posledica je prisustva karboksilnih i tiolnih funkcionalnih grupa na površini čestica. Ovim je ujedno i potvrđena efikasnost funkcionalizacije SMNČ sa DMSA.

4.3.2.4. Karakterizacija DMSA-SMNČ metodom FTIR

FTIR spektroskopijom ispitana je uspešnost funkcionalizacije sintetisanih SMNČ sa DMSA, kao i razumevanje njihovih interakcija. Oblaganjem SMNČ sa DMSA, dolazi do interakcije hidroksilnih grupa koje su deo karboksilnih funkcionalnih grupa DMSA i SMNČ i stvaranja polarnih Fe-O-C veza uz izdvajanje molekula vode. Takođe, slobodne tiolne grupe DMSA međusobno reaguju i stvaraju disulfidne -S-S-veze u omotaču. Na slici 31 prikazani su FTIR spektri SMNČ, DMSA i DMSA-SMNČ.



Slika 31. FTIR spektri SMNČ, DMSA i funkcionalizovane SMNČ sa DMSA

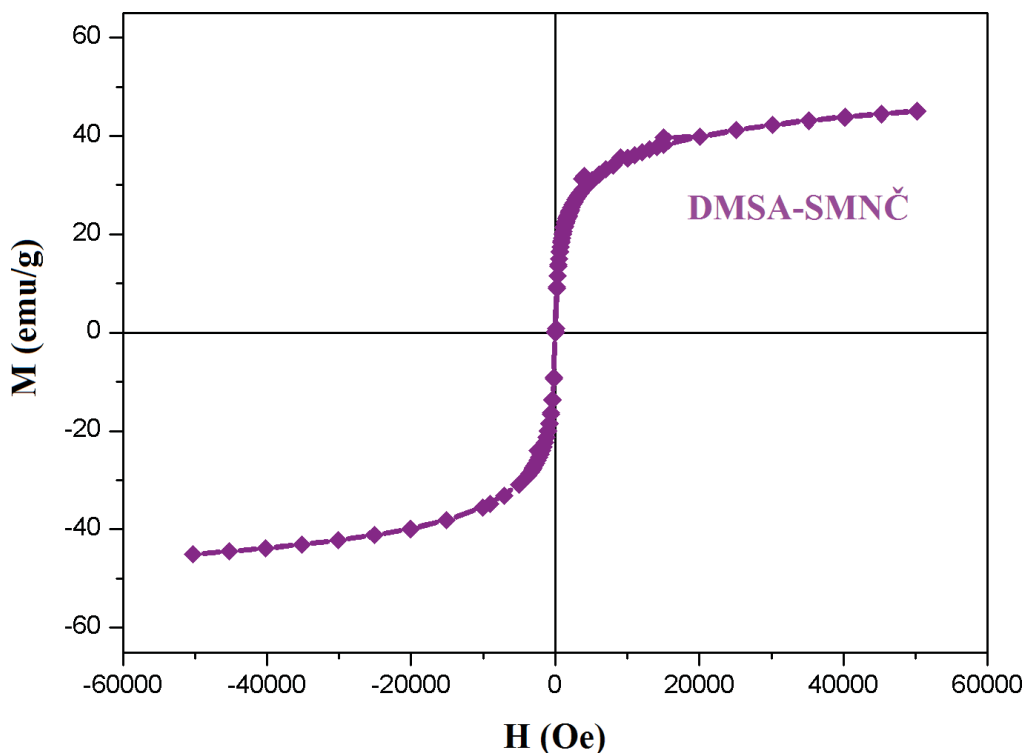
FTIR spektri SMNČ, snimani u regionu od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} , ne pokazuju prisustvo ostataka organskih faza. U spektrima (SMNČ i DMSA-SMNČ) se na 540 cm^{-1} uočava apsorpciona traka koja potiče od istežuće vibracije metal-kiseonik, Fe-O veze i potvrđuje prisustvo Fe_3O_4 nanočestica. Prema literaturnim podacima, vrednost istežuće vibracije metal-kiseonik faze za magnetit (FeO) iznosi 545 cm^{-1} (210). U spektru DMSA uočavaju se apsorpcione trake na 1632 i 1350 cm^{-1} koje potiču

od simetričnih i asimetričnih vibracija istezanja karboksilnih -COO^- grupa. Široka traka na 2532 cm^{-1} odgovara vibraciji istezanja S-H veze tiolne grupe. Traka koja potiče od istezanja C-O-Fe veze prisutna u spektru DMSA-SMNČ na 1050 cm^{-1} potvrđuje da su molekuli DMSA vezani za površinu SMNČ (211). Takođe potvrdu oblaganja SMNČ sa DMSA predstavljaju i trake na 1632 i 1350 cm^{-1} koje se odnose na simetrično i asimetrično istezanje karboksilnih -COO^- grupa. Razlog odsustva -SH grupe u spektru DMSA-SMNČ je oksidacija -SH grupa u disulfidne -S-S- grupe koje apsorbuju u nižoj IR oblasti. FTIR analiza je takođe potvrdila prisustvo DMSA na površini SMNČ-a, što je dokaz uspešnog oblaganja SMNČ.

4.3.2.5. Magnetna svojstva DMSA-SMNČ

Magnetna svojstva DMSA-SMNČ ispitana su pomoću SQUID magnetometra. Zavisnost magnetizacije od primenjenog magnetnog polja (histerezisna kriva, slika 32) za DMSA-SMNČ merena je na konstantnoj temperaturi od 300 K, u opsegu jačine magnetnog polja od -5 T do +5 T. Vrednost saturacione magnetizacije je određena ekstrapolacijom magnetizacije M u zavisnosti od $1/H$ i dobijena vrednost M_s na $T=300\text{ K}$ iznosi $42,6\text{ emu/g}$ za DMSA-SMNČ.

Dobijena niža vrednosti izmerene M_s za DMSA-SMNČ u odnosu na neobložene SMNČ ($50,1\text{ emu/g}$, slika 28) se može objasniti prisustvom nemagnetnog sloja DMSA na njihovoj površini.



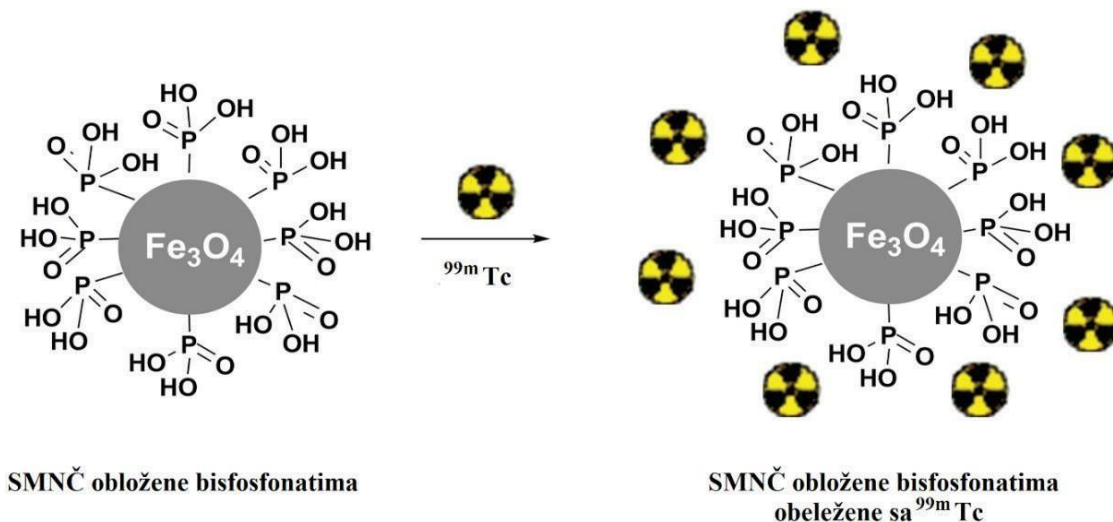
Slika 32. Histerezisna kriva za DMSA-SMNČ na $T=300\text{ K}$

4.3.2.6. Magnetna hipertermija DMSA-SMNČ

Kako bi se ispitala mogućnost upotrebe nanočestica u magnetnoj hipertermiji, efikasnost zagrevanja DMSA-SMNČ je određena merenjem SAR vrednosti (W/g) u promenljivom magnetnom polju jačine $H=23.9$ kA/m i frekvencijama od 252 kHz, 397 kHz i 577 kHz. Određivanjem nagiba ($\Delta T/\Delta t$) sa krive promene temperature ferrofluida sa vremenom, izračunata je SAR vrednost za DMSA-SMNČ. Vrednosti specifične brzine apsorpcije DMSA-SMNČ su iznosile 35,9 W/g, 61,3 W/g i 102,6 W/g pri frekvencijama 252 kHz, 397 kHz i 577 kHz, redom. Za neobložene SMNČ nije određena SAR vrednost zbog nestabilnosti uzoraka u vodenoj sredini.

4.4. Radioobeležavanje obloženih SMNČ

Jedan od ciljeva ove disertacije je ispitivanje uslova za radioobeležavanje obloženih SMNČ različitim radionuklidima koji se koriste u dijagnostici ili terapiji različitih oboljenja. Jedan od radionuklida koji je korišćen za ispitivanja je ^{99m}Tc , koji se već nekoliko decenija, zbog gotovo idealnih fizičkih karakteristika, koristi u medicini u skoro 85% dijagnostičkih procedura. On omogućava, uz relativno nisko izlaganje zračenju, jasnu vizualizaciju unutrašnjih anatomskih struktura i organa i procenu njihove funkcije. Na slici 33 predstavljen je shematski prilaz radioobeležavanja SMNČ sa ^{99m}Tc .



Slika 33. Shematski prikaz radioobeležavanja SMNČ obloženih difosfonatima sa ^{99m}Tc .

Drugi radionuklid koji je korišćen za ispitivanja je $^{177}\text{Lu}^{3+}$, koji se danas sve više koristi u terapiji različitih malignih bolesti.

4.4.1. Radioobeležavanje obloženih SMNČ tehnećijumom-99m

Rezultati prinosa obeležavanja obloženih SMNČ tehnećijumom-99m, dobijeni instant hromatografijom na tankom sloju - ITLC (SG) sa dve mobilne faze, prikazani su u tabelama 6, 7 i 8. U ovim eksperimentima koncentracija obloženih SMNČ je bila konstantna (5 mg/ml) kao i pH 4, dok se količina redukujućeg sredstva, Sn(II)-jona menjala.

Tabela 6. Uticaj količine SnCl_2 na prinos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP-SMNČ

SnCl_2 (μg)	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP-SMNČ (%)	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (%)	Radiokoloidi $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ (%)
275	$95,2 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,6$	$4,4 \pm 1,1$
300	$91,2 \pm 2,2$	$2,7 \pm 0,5$	$7,1 \pm 1,3$
350	$82,4 \pm 4,1$	$2,3 \pm 1,1$	$16,3 \pm 2,8$
400	$69,2 \pm 4,6$	$3,8 \pm 2,1$	$28,0 \pm 3,3$

Tabela 7. Uticaj količine SnCl_2 na prinos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP-SMNČ

SnCl_2 (μg)	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP-SMNČ (%)	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (%)	Radiokoloidi $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ (%)
275	$65,5 \pm 5,3$	$34,3 \pm 3,1$	$1,1 \pm 0,6$
300	$73,2 \pm 2,8$	$25,4 \pm 2,1$	$2,4 \pm 1,1$
350	$84,6 \pm 3,7$	$14,2 \pm 2,3$	$2,2 \pm 1,0$
400	$97,4 \pm 1,3$	$1,4 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,5$

Tabela 8. Uticaj količine SnCl_2 na prinos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA-SMNČ

SnCl_2 (μg)	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA-SMNČ (%)	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (%)	Radiokoloidi $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ (%)
275	$58,3 \pm 4,1$	$36,3 \pm 2,8$	$6,4 \pm 2,1$
300	$67,5 \pm 5,2$	$28,4 \pm 2,2$	$5,1 \pm 2,6$
350	$86,2 \pm 4,3$	$12,4 \pm 2,7$	$2,4 \pm 1,0$
400	$98,3 \pm 0,4$	$1,5 \pm 1,1$	$1,2 \pm 0,5$

Količina redukcionog sredstva je jedan od ključnih parametara u procesu radioobeležavanja jedinjenja ili čestica radionuklidom $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Tokom optimizacije uslova obeležavanja uglavnom se Sn(II) -hlorid dodaje u višku u odnosu na $^{99\text{m}}\text{Tc}$ da bi se obezbedila potpuna redukcija $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Međutim, prisustvo značajnog viška SnCl_2 može dovesti i do stvaranja nepoželjnih radiokoloida koji imaju potpuno drugačije puteve biodistribucije i samim tim predstavljaju radiohemijsku nečistoću. Preuzimanje radiokoloida od strane RES-a značajno povećava dozu zračenja koju prime jetra, slezina i koštana srž.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da se obložene SMNČ mogu obeležiti $^{99\text{m}}\text{Tc}$ u prisustvu kalaj(II)-jona u visokom prinosu ($> 95\%$). Količina redukcionog sredstva

koja je potrebna za uspešno obeležavanje obloženih SMNČ sa ^{99m}Tc , optimizovana je na 275 μg (za MDP-SMNČ) i 400 μg (za HEDP-SMNČ i DMSA-SMNČ).

Poznato je da pH vrednost sredine ima jak uticaj na građenje kompleksa, kao i na njihovu stabilnost. U ovoj disertaciji ispitan je uticaj pH vrednosti suspenzije (pH 3 do pH 8) na građenje i stabilnost kompleksa ^{99m}Tc sa obloženim SMNČ, kao i na prinos obeležavanja. U opsegu pH od 4 do 6, prinos je bio veći od 95% i nije bilo značajnih razlika u prinosu radioobeležavanja kod svih obloženih SMNČ, dok je na nižim i na višim pH prinos bio niži od 85%.

Reakciono vreme, kao i temperatura na kojoj dolazi do obeležavanja obloženih SMNČ sa ^{99m}Tc su takođe parametri koji utiču na prinos obeležavanja i stabilnost obeleženih čestica. Dokazano je da se visok prinos obeležavanja (>95%) obloženih SMNČ dobija već nakon 30 minuta na sobnoj temperaturi. Produžavanjem trajanja reakcije do 60 min nema značajnog uticaja na prinos obeležavanja. Povišena temperatura (95 °C) dovodi do značajnog smanjenja prinosa obeležavanja. Za ^{99m}Tc -MDP -SMNČ i ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ prinos je iznosio $73,8 \pm 1,0\%$ i $72,6 \pm 1,3\%$, dok je za ^{99m}Tc -DMSA-SMNČ vrednost bila još niža ($67,4 \pm 0,5\%$). U tabeli 9 prikazani su prinosi radioobeležavanja, dobijeni na sobnoj temperaturi i na pH 4.

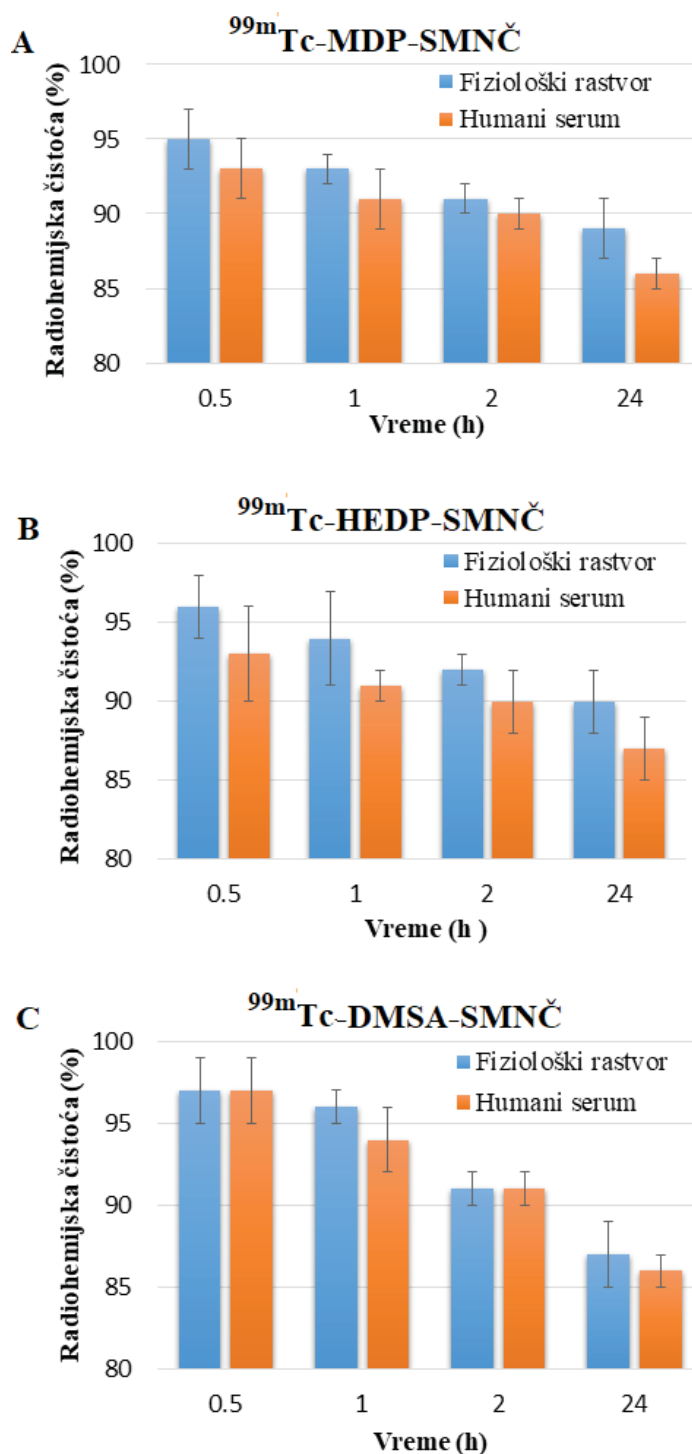
Tabela 9. Uticaj reakcionog vremena na prinos obeležavanja obloženih SMNČ sa ^{99m}Tc na sobnoj temperaturi i pH 4.

Obložene SMNČ obeležene ^{99m}Tc	Prinos (%)	
	30 min	60 min
^{99m}Tc -MDP-SMNČ	$95,1 \pm 1,2$	$94,8 \pm 1,0$
^{99m}Tc -HEDP-SMNČ	$97,1 \pm 0,9$	$96,5 \pm 1,1$
^{99m}Tc -DMSA-SMNČ	$98,0 \pm 1,0$	$96,2 \pm 0,8$

Pošto je prinos radioobeležavanja bio veoma visok kod sve tri grupe radioobeleženih SMNČ, nije bilo potrebe za njihovim prečišćavanjem od viška slobodnog ^{99m}Tc metodom taloženja pomoću spoljašnjeg magneta (213).

4.4.1.1. Studije in vitro stabilnosti obloženih SMNČ obeleženih sa ^{99m}Tc

Radiohemijska čistoća obloženih SMNČ obeleženih sa ^{99m}Tc , ispitana je tokom 24 sata u humanom serumu i fiziološkom rastvoru na 37 °C. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 34. Dobijeni rezultati su pokazali da nakon inkubacije od 24 sata u fiziološkom rastvoru i humanom serumu više od 85% ^{99m}Tc ostaje vezano za obložene SMNČ. Radiohemijska čistoća svih obloženih SMNČ obeleženih sa tehnecijumom-99m je bila nešto niža nakon 24 sata inkubacije u humanom serumu u odnosu na inkubaciju u fiziološkom rastvoru. Na osnovu dobijenih rezultata, možemo zaključiti da tehnecijum-99m gradi jake koordinativno kovalentne veze sa funkcionalnim grupama na površini nanočestica, čime je omogućena velika stabilnost radioobeleženih obloženih SMNČ u fiziološkom rastvoru i humanom serumu. Ovako dobijene radioobeležene čestice su pogodne za dalja ispitivanja u cilju in vivo primene.

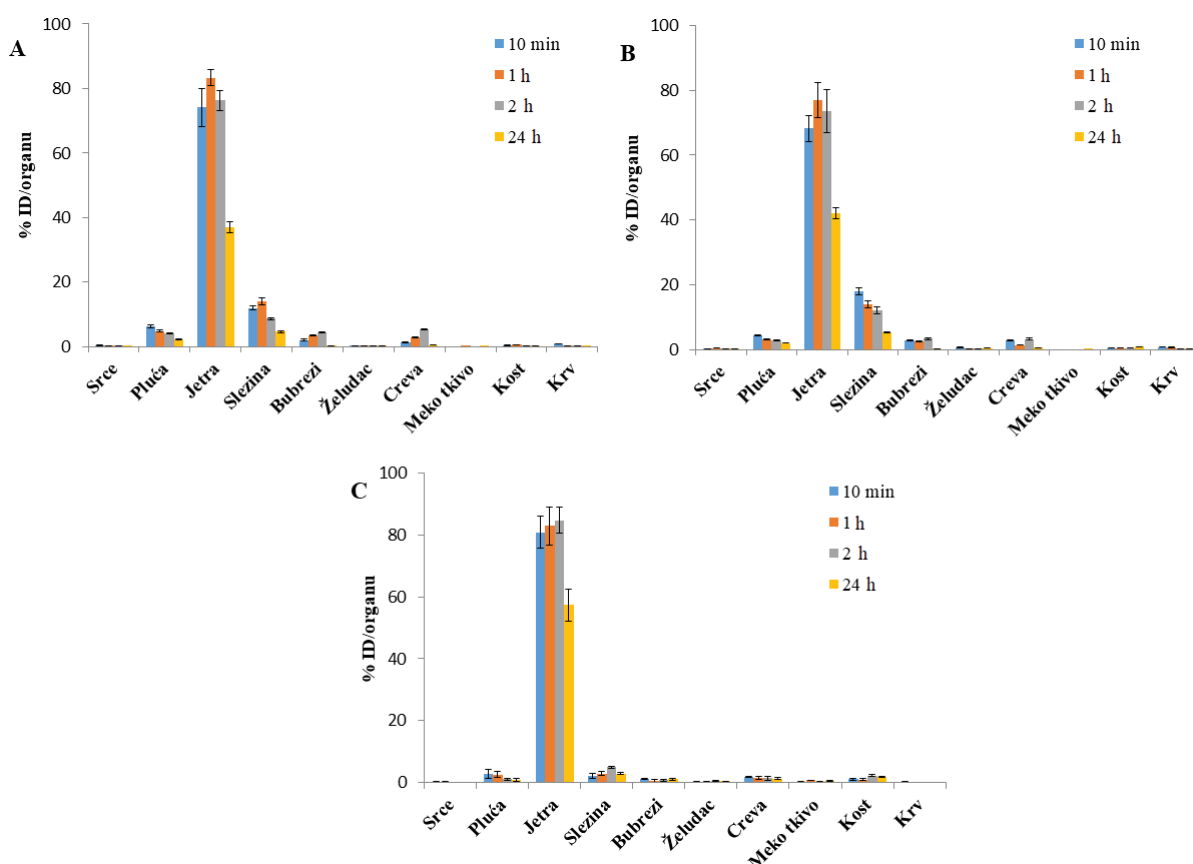


Slika 34. *In vitro* stabilnost ^{99m}Tc -MDP-SMNC, ^{99m}Tc -HEDP-SMNC i ^{99m}Tc -DMSA-SMNC u fiziološkom rastvoru i humanom serumu, nakon inkubacije na 37 °C u toku 24 sata.

4.4.1.2. Studije *ex vivo* biodistribucije obloženih SMNC obeleženih sa ^{99m}Tc

Rezultati ispitivanja biodistribucije ^{99m}Tc obeleženih obloženih SMNC na zdravim pacovima soja Wistar prikazani su na slici 35. Nakon intravenskog injektovanja, radioaktivno obeležene nanočestice karakteriše brzi klirens iz sistemske cirkulacije i značajan porast radioaktivnosti u jetri i slezini već nakon 10 minuta. Značajno manja radioaktivnost

uočena je u plućima i bubrezima. Radioaktivnost u plućima je, pretpostavljamo, posledica međusobnog slepljivanja obloženih SMNČ usled van der Waals-ovih interakcija. Kako rezultati pokazuju, ova pojava je nešto izraženija kod ^{99m}Tc -MDP-SMNČ u odnosu na ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ i ^{99m}Tc -DMSA-SMNČ. Mali procenat ($< 3\%$) radioaktivnosti u bubrezima ukazuje na zadovoljavajuću *in vivo* stabilnost radioobeleženih čestica, jer dolazi do degradacije u fiziološkim uslovima samo malog broja čestica, a oslobođeni ^{99m}Tc se veoma brzo eliminiše putem bubrega. Maksimalno nakupljanje u jetri je 1 sat nakon injektovanja ^{99m}Tc -MDP-SMNČ i ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ ($83,30 \pm 2,5$ i $77,10 \pm 5,3$ % ID/organu) i slezini ($14,1 \pm 1,0$ i $18,0 \pm 1,26$ % ID/organu). Kod ^{99m}Tc -DMSA-SMNČ, maksimalno nakupljanje u jetri je nakon 2 sata od intravenskog injektovanja ($84,69 \pm 4,20$ % ID/organu), dok je u slezini $4,97 \pm 0,31$ % ID/organu. U ostalim organima uočeno je zanemarljivo prisustvo radioaktivnosti.



Slika 35. Biodistribucija: A) ^{99m}Tc -MDP-SMNČ; B) ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ i C) ^{99m}Tc -DMSA-SMNČ nakon i.v. primene u zdravim (normalnim) Wistar pacovima ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$). Vrednosti radioaktivnosti po organima sa vremenom su korigovane primenom zakona radioaktivnog raspada. Raspodela po organima kost, meko tkivo i krv računata je na celu njihovu masu u organizmu miša tj. krv $\sim 8\%$, kosti $\sim 10\%$, meko tkivo $\sim 40\%$ od ukupne telesne mase pacova.

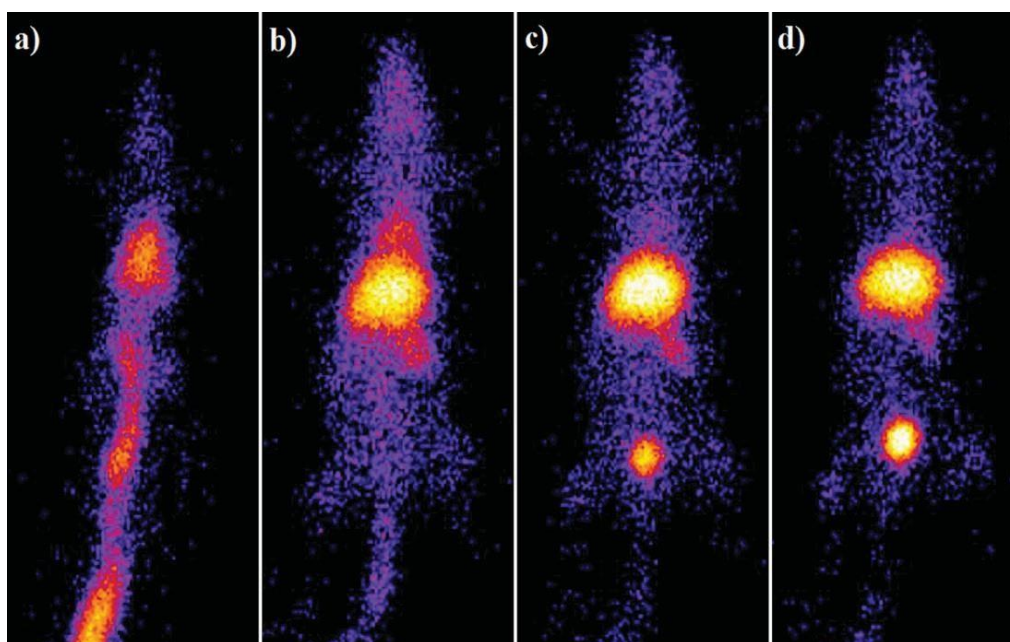
Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja obloženih SMNČ obeleženih tehnecijumom-99m, kao i na osnovu SAR vrednosti za sve tri obložene SMNČ (MDP-SMNČ, HEDP-SMNČ, DMSA-SMNČ), može se zaključiti da su ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ pokazale najpovoljnije osobine i da bi zato mogle da se koriste za njihovo dalje ispitivanje kao potencijalnog teranostičkog agensa.

4.4.1.3. Scintigrafske studije sa ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ

Scintigrafija je nuklearnomedicinska dijagnostička metoda koja se zasniva na praćenju prostorne raspodele gama zračenja, specijalnom kamerom, nakon i.v. injektovanja radiofarmaceutika. Ova metoda ima veliki značaj jer za razliku od drugih metoda, pruža mogućnost istovremenog ispitivanja morfologije i funkcije organa.

Kako nije bilo značajne razlike u dobijenim rezultatima biodistribucije za sva tri uzorka (^{99m}Tc -MDP-SMNČ, ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ i ^{99m}Tc -DMSA-SMNČ) nakon intravenskog injektovanja, snimani su na Gama kameri (Siemens e_cam, Duall Head, SAD) samo Wistar pacovi kojima je injektovan ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ. Snimanje je izvedeno nakon 10 s, 1 min, 10 min i 60 min od injektovanja. Dobijeni scintigrafski snimci ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ prikazani su na slici 36. Na prikazanim snimcima se može uočiti da je najveća radioaktivnost u predelu jetre i slezine, dok je zanemarljiva radioaktivnost primećena u svim ostalim organima.

Nakon 10 minuta od injektovanja, uočava se radioaktivnost u mokraćnoj bešici, što ukazuje da dolazi do degradacije malog broja ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ u fiziološkim uslovima i oslobođeni ^{99m}Tc se eliminiše putem bubrega. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno dobijenim rezultatima biodistribucije. Nakon 1 minuta od injektovanja, uočava se i radioaktivnost u plućima, koja se smanjuje sa vremenom. Ovi rezultati ukazuju da se agregati koji nastaju i.v. injektovanjem ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ zadržavaju u kapilarima pluća, ali vremenom usled pritiska struje krvi dolazi do njihovog potiskivanja i prolaska kroz lumen kapilara (214,215).



Slika 36. Scintigrafski snimci zdravih Wistar pacova nakon injektovanja ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ u vremenskim intervalima: a) 10 s, b) 1 min, c) 10 min i d) 60 min.

4.4.2. Radioobeležavanje obloženih SMNČ lutecijumom-177

Za obeležavanje obloženih SMNČ radionuklidom ^{177}Lu korišćena je metoda direktnog vezivanja radionuklida za funkcionalne grupe na površini obloženih SMNČ.

Kod određivanja radiohemijske čistoće, slobodni $^{177}\text{Lu}^{3+}$ joni predstavljali su jedinu radiohemijsku nečistoću. U tabeli 10 prikazani su reakcioni uslovi pod kojima su dobijeni maksimalni prinosi radioobeležavanja obloženih SMNČ.

Tabela 10. Maksimalni prinosi radioobeležavanja obloženih SMNČ sa ^{177}Lu određeni ITLC- SG metodom

Obložene SMNČ obeležene ^{177}Lu	Reakciono vreme (min)	Temperatura (°C)	Prinos radioobeležavanja (%)
^{177}Lu -MDP-SMNČ	60	25	74,2 ± 0,3
^{177}Lu -HEDP-SMNČ	60	25	72,5 ± 1,2
^{177}Lu -DMSA-SMNČ	30	25	86,6 ± 2,1

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je najveći prinos (> 70%) radioobeležavanja SMNČ obloženih bisfosfonatima sa $^{177}\text{Lu}^{3+}$ dobijen inkubacijom nanosuspenzije u toku 60 minuta, na sobnoj temperaturi pri pH 4. Povećanje temperature i kraće reakciono vreme nisu uticali na povećanje prinosa obeležavanja SMNČ obloženih bisfosfonatima. Rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim od strane Radović i saradnika (166). Kada su u pitanju DMSA-SMNČ, najveći prinos radioobeležavanja sa $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (> 85%) je dobijen nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u toku 30 minuta na pH 6,5 (167). Povećanjem temperature i reakcionog vremena nije postignut veći prinos ^{177}Lu -DMSA-SMNČ.

Kako je najveći prinos obeležavanja sa ^{177}Lu dobijen sa DMSA-SMNČ, sva dalja ispitivanja izvođena su sa ^{177}Lu -DMSA-SMNČ.

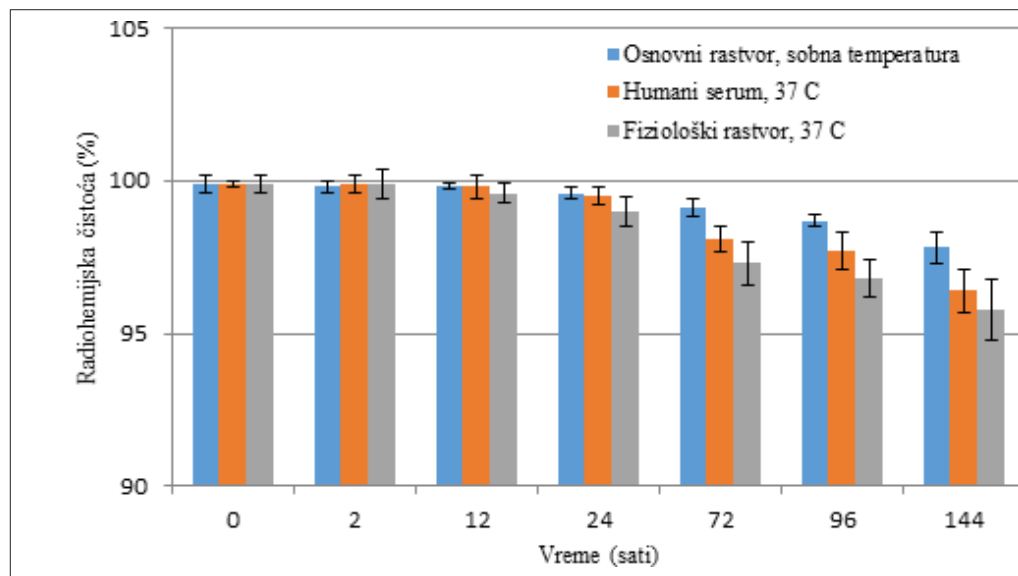
Pre primene u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima, iz nanosuspenzije ^{177}Lu -DMSA-SMNČ je metodom magnetne dekantacije odstranjen slobodni $^{177}\text{Lu}^{3+}$. Dobijeni talog ^{177}Lu -DMSA-SMNČ je resuspendovan u redestilovanoj vodi. Radiohemijska čistoća prečišćenih ^{177}Lu -DMSA-SMNČ bila je > 99%.

4.4.2.1. In vitro stabilnost ^{177}Lu -DMSA-SMNČ

In vitro stabilnost ^{177}Lu -DMSA-SMNČ ispitana je tokom stajanja osnovne nanosuspenzije na sobnoj temperaturi, kao i u humanom serumu i fiziološkom rastvoru na 37 °C tokom 6 dana (144 sati) od obeležavanja sa ^{177}Lu (slika 37). Radiohemijska čistoća određena je metodom uzlazne ITLC hromatografije. Slobodan $^{177}\text{Lu}^{3+}$ koji nastaje degradacijom ^{177}Lu -DMSA-SMNČ predstavlja radiohemijsku nečistoću.

Na osnovu dobijenih rezultata *in vitro* stabilnosti ^{177}Lu -DMSA-SMNČ u fiziološkom rastvoru i humanom serumu nakon 144 sata, može se zaključiti da ^{177}Lu gradi stabilne koordinativno kovalentne veze sa negativno naelektrisanim funkcionalnim grupama na površini čestica, tako da slobodni joni u fiziološkom rastvoru i proteini humanog seruma nemaju značajan uticaj na tu vezu. Radiohemijska čistoća suspenzije bila je > 95 %, što znači da se manje od 3% $^{177}\text{Lu}^{3+}$ oslobodilo nakon 144 sata. Takođe, ostavljanjem osnovne suspenzije ^{177}Lu -DMSA-SMNČ na sobnoj temperaturi, nema značajnog uticaja

na radiohemijsku čistoću radioobeleženih nanočestica ($> 97\%$). Ovi rezultati ukazuju da se ^{177}Lu -DMSA-SMNČ može primeniti u *in vivo* ispitivanjima (slika 37).



Slika 37. *In vitro* stabilnost ^{177}Lu -DMSA-SMNČ u osnovnoj nanosuspenziji na sobnoj temperaturi, kao i u humanom serumu i fiziološkom rastvoru na 37 °C ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$)

4.4.2.2. Ispitivanje biološke raspodele ^{177}Lu -DMSA-SMNČ

4.4.2.2.1. Ispitivanje biološke raspodele ^{177}Lu -DMSA-SMNČ nakon i.v. injekcije

Osnovni uslov koji mora biti ispunjen, kako bi se nanočestice mogle primeniti u čoveka je biokompatibilnost i stabilnost u fiziološkim uslovima.

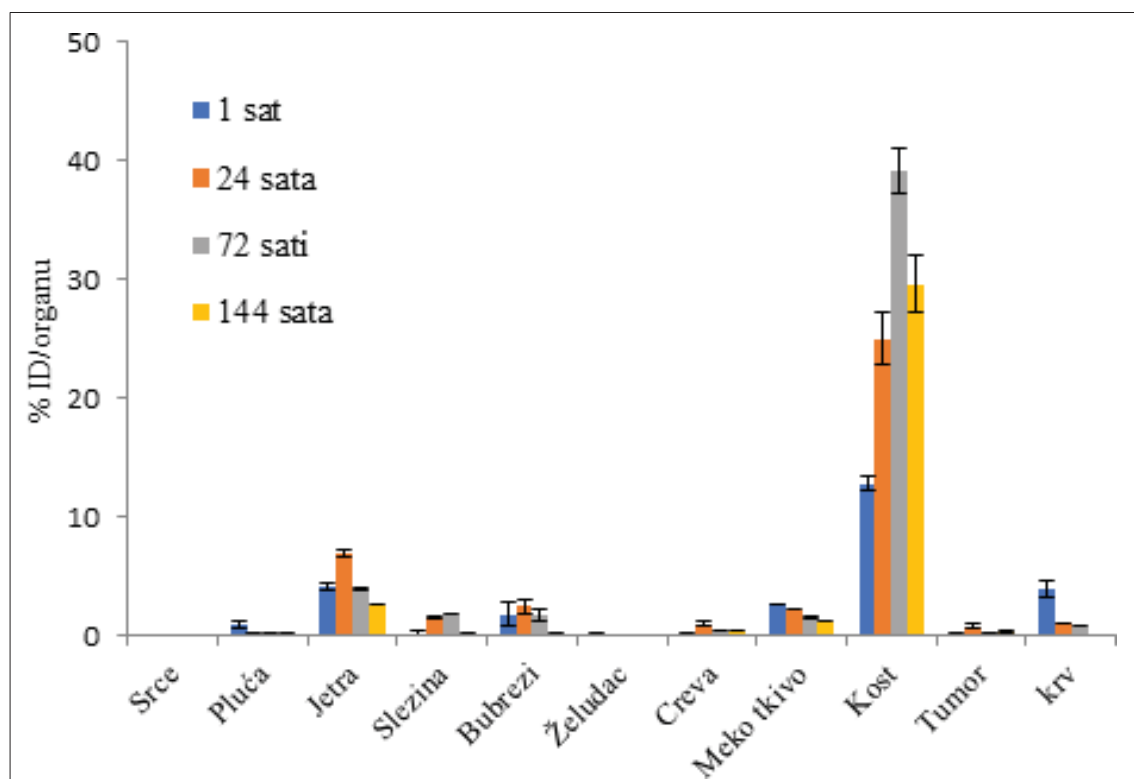
Biološko ponašanje nanočestica zavisi od mnogobrojnih faktora. Stoga je bilo neophodno ispitati uticaj postupka sinteze, funkcionalizacije dobijenih SMNČ sa DMSA i radioobeležavanja na biodistribuciju, kao i njihovu *in vivo* stabilnost u BALB/c miševima sa indukovanim ksenograftima CT-26 i 4T1 tumora.

Poznato je da biološko ponašanje nanočestica u organizmu zavisi i od načina njihove primene. U literaturi se mogu naći podaci o različitim putevima primene nanočestica, poput per os, intraperitonealne, inhalacione. Međutim, najveći broj ispitivanja se odnosio na njihovu intravensku primenu (103,105).

Biološka raspodela i *in vivo* stabilnost i.v. injektovanih ^{177}Lu -DMSA-SMNČ ispitivana je u funkciji vremena, na eksperimentalnom modelu miša.

Na slici 38 prikazani su rezultati biološke raspodele $^{177}\text{LuCl}_3$ (0,5 MBq/ 50 μl) po organima BALB/c miševa sa indukovanim ksenograftima CT-26 tumora dobijeni 1, 24, 72 i 144 sata nakon i.v. primene. Dobijeni rezultati pokazuju da se $^{177}\text{Lu}^{3+}$ veoma kratko vreme zadržava u cirkulaciji, što bi se moglo objasniti brзом nespecifičnom distribucijom $^{177}\text{Lu}^{3+}$ u intersticijalne i intracelularne fluide. Nakon 24 sata, samo 1% od injektovane doze se nalazi u krvi. $^{177}\text{Lu}^{3+}$ se distribuira u jetru i slezinu. Nakon jednog sata, oko 9,23% injektovane doze (ID) se nalazi u jetri, dok je 4,43% u slezini. Prisustvo radioaktivnosti u jetri i slezini se može objasniti hidrolizom $^{177}\text{Lu}^{3+}$ na $\text{pH} > 7$ (pH krvi) i formiranjem hidroksida ($\text{Lu}(\text{OH})$ ili $\text{LuO}(\text{OH})$) koji se zatim veoma brzo preuzimaju od strane ćelija RES-a. Nakon intravenske primene, rastvorljive hidrolitičke forme $^{177}\text{Lu}^{3+}$ se eliminišu jednim delom iz organizma i putem bubrega. Radioaktivnost u bubrezima raste i maksimalna vrednost se postiže 48 sati nakon i.v. primene (4,58% ID). Nakupljanje $^{177}\text{Lu}^{3+}$ u kostima

raste u funkciji vremena, od 12,80% ID 1 sat nakon i.v. primene, do 39,04% ID nakon 48 sati. Kost su ciljno mesto vezivanja $^{177}\text{Lu}^{3+}$, jer se on vezuje za hidroksiapatit. Dobijene vrednosti su očekivane tj. u skladu sa literaturnim podacima (216).

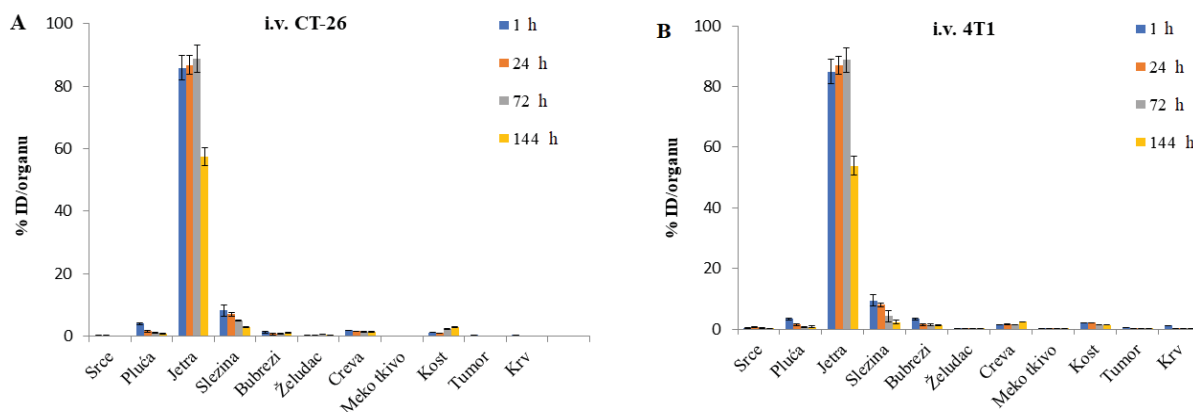


Slika 38. Biodistribucija $^{177}\text{LuCl}_3$ (% ID/organu) nakon i.v. primene, u BALB /c miševima sa indukovanim ksenograftima CT-26 tumora, ($x \pm \text{SD}$, $n = 3$). (Raspodela po organima kao što je krv, kost, meko tkivo računata je na celu njihovu masu u organizmu miša tj. krv ~ 8%, kosti ~10%, meko tkivo ~ 40% od ukupne telesne mase miša).

Rezultati ispitivanja biodistribucije ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (0,5 MBq/0,04 mg/50 μl) pokazuju da je njihova raspodela po organima BALB/c miševa sa indukovanim ksenograftima CT-26 i 4T1 tumora nakon i.v. primene u saglasnosti sa literaturnim podacima (126, 215). Dobijeni rezultati prikazani su na slici 39. Najveća radioaktivnost (procenat injektovane doze (%ID)) je izmerena u jetri i slezini tokom celog perioda ispitivanja. Preko 85% ID se nalazi u jetri, oko 8% ID u slezini, dok je nakupljanje u ostalim organima manje od 3% nakon 1 sata od injektiranja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (Slike 39A i 39B). Slični rezultati (manje od 1% ID u tumoru) dobijeni su za oba eksperimentalna modela (CT-26 i 4T1), 1, 24, 72 i 144 sata nakon intravenske primene ^{177}Lu -DMSA-SMNČ. Izmerena radioaktivnost u krvi je bila manja od 1,5% ID u svim ispitivanim vremenskim intervalima, što govori o njihovom izuzetno brzom uklanjanju iz cirkulacije od strane RES-a.

Najveće nakupljanje ^{177}Lu -DMSA-SMNČ u svim vremenskim intervalima je u jetri, što se može objasniti fizičko-hemijskim karakteristikama DMSA-SMNČ jer veoma brzo po ulasku u cirkulaciju, dolazi do njihove opsonizacije od strane proteina plazme i fagocitoze od strane RES-a.

Nakon 72 sata, uočava se trend smanjanja radioaktivnosti u jetri, što se može objasniti degradacijom unetih čestica pod dejstvom enzima u lizozomima Kupferovih ćelija jetre (218).



Slika 39. Biodistribucija ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (% ID/organu) nakon i.v. primene, u BALB /c miševima sa indukovanim ksenograftima: a) CT-26 tumora i b) 4T1 tumora ($x \pm \text{SD}$, $n = 3$). Raspodela radioaktivnosti po organima, kost, meko tkivo i uzorku krvi preračunava se na celu njihovu masu u organizmu miša tj. krv ~ 8%, kosti: ~10%, mišićno tkivo: ~ 40% od ukupne telesne mase miša)

Na osnovu prikazanih rezultata, možemo da zaključimo da funkcionalizacija površine SMNČ sa DMSA omogućava građenje jake koordinativno kovalentne veze sa ^{177}Lu i da je nagrađeni kompleks stabilan u ispitivanim vremenskim intervalima u *in vivo* uslovima. Mala radioaktivnost u kostima ($< 3\%$ ID), pokazuje da ne dolazi do značajnije razgradnje kompleksa i oslobađanja slobodnog $^{177}\text{Lu}^{3+}$.

Iz dobijenih rezultata takođe možemo zaključiti da je nakupljanje ^{177}Lu -DMSA-SMNČ u tkivima i CT-26 i 4T1 tumora nakon i.v. primene izuzetno malo ($< 1\%$ ID/tumor). Ova količina radioaktivnosti u tumorima nije dovoljna da β^- zračenje ^{177}Lu u tumorskom (ciljnom) tkivu ispolji svoj terapijski efekat, a sa druge strane velika radioaktivnosti u jetri i slezini dovodi do značajnog povećanja efektivne doze u njima, što nosi rizik od ozbiljnih oštećenja tih organa.

Kako nije postignuto značajnije nakupljanje ^{177}Lu -DMSA-SMNČ u tumorskim tkivima nakon njihove intravenske primene, u daljem radu su ^{177}Lu -DMSA-SMNČ injektovane putem intratumorske injekcije.

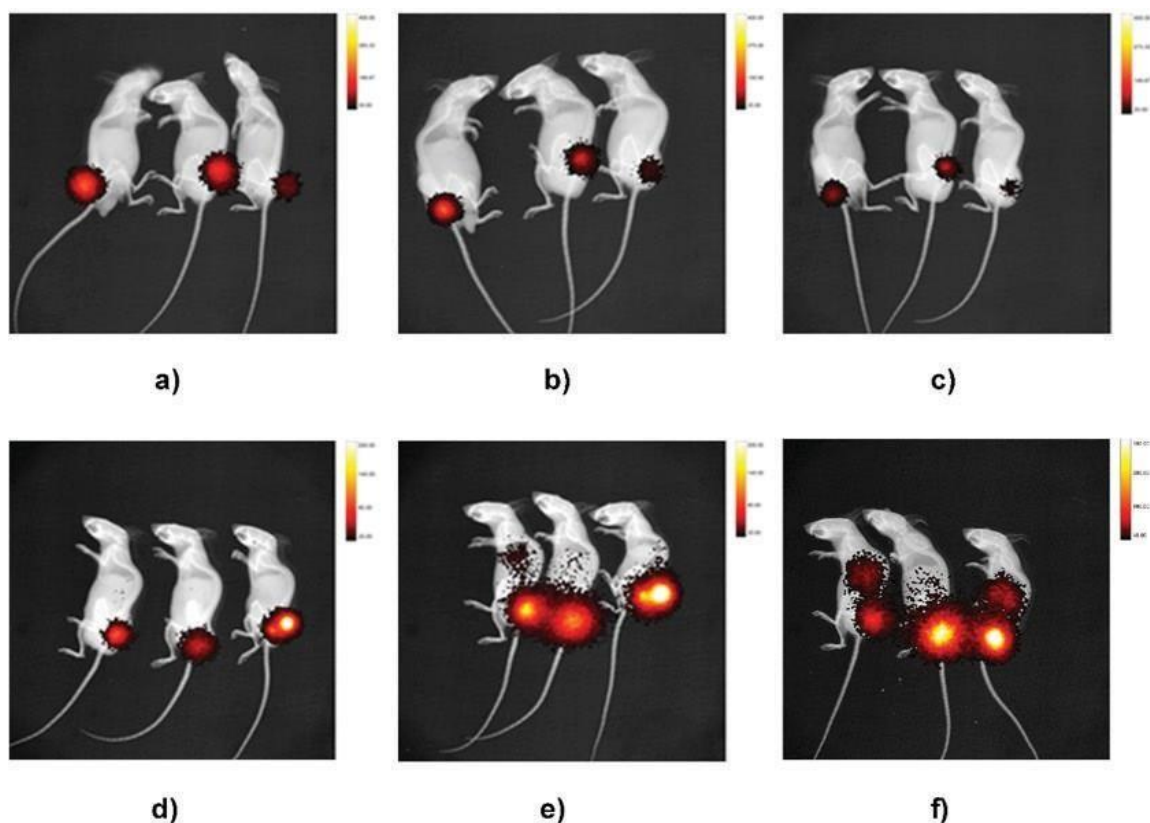
4.4.2.2.2. Ispitivanje biološke raspodele ^{177}Lu -DMSA-SMNČ nakon i.t. injekcije

Da bi lek mogao da ispolji svoj terapijski efekat pri i.t. načinu primene, neophodno je njegovo prolongirano zadržavanje u tumorskom tkivu. Od dužine vremena zadržavanja u tumorskom tkivu zavisi i njegova terapijska efikasnost. Stoga je bilo neophodno da se ispita vreme zadržavanja ispitivanih ^{177}Lu -DMSA-SMNČ u tumorskom tkivu.

Snimci miševa sa indukovanim CT-26 tumorima pokazali su da je celokupna injektovana radioaktivnost bila u tumorskom tkivu kao i da nije detektovana radioaktivnost u drugim organima i tkivima tokom celokupnog perioda ispitivanja (Slika 40 a), b), c)). Ovo se može objasniti i strukturom samog CT-26 tumora. Ovaj tip tumora ima konzistentnu strukturu i po prirodi je slabo vaskularizovan pa je oslobađanje radioaktivnosti iz njih bilo ograničeno.

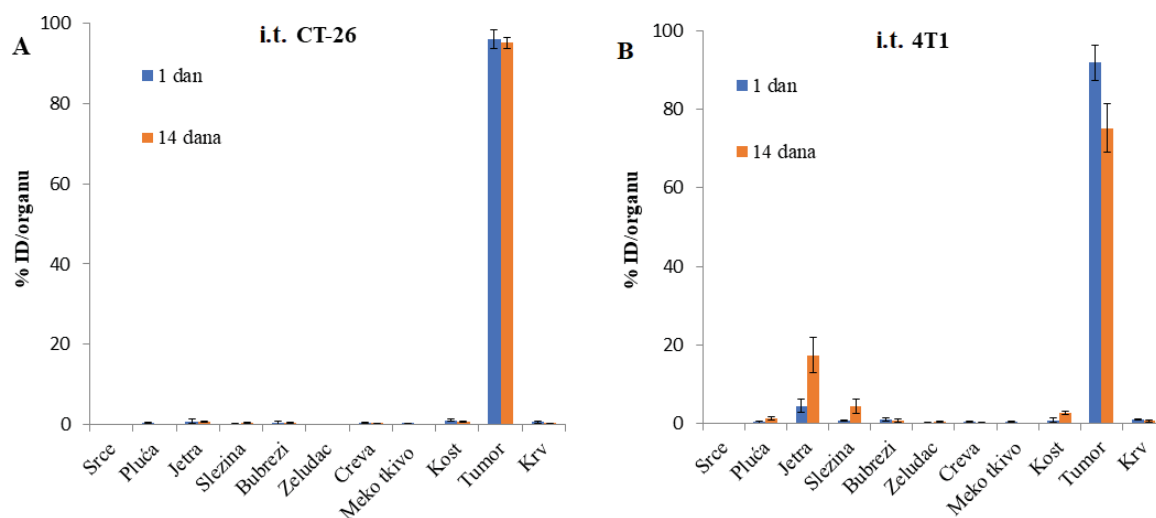
Kod miševa sa indukovanim 4T1 tumorima, na snimcima dobijenim nakon prvog dana od i.t. injektovanja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ radioaktivnost se uočava samo u tumorskom tkivu. Međutim, 5. i 11. dana od injektovanja određena doza radioaktivnosti se detektuje i u jetri i slezini (Slika 40 d), e), f)). Ovo se može objasniti i prirodom i građom samog tumora. Za razliku od CT-26 tumora, 4T1 tumore karakteriše agresivan rast i intenzivna tumorska angiogeneza, tj. sposobnost tumora da stvara sopstvenu mrežu krvnih sudova

čiji je zid, zbog slabijeg kvaliteta, povećano propustljiv za čestice koje se injektuju u ekstracelularni prostor unutar tumora. Čestice koje su injektovane u blizini krvnog suda dospevaju u sistemsku cirkulaciju i bivaju veoma brzo prepoznate i preuzete od strane ćelija RES-a. Takođe, sastav strome u velikoj meri utiče na prenos materija u tumor i iz tumora. Moguće je da razlika u sastavu strome dve vrste tumora igra ključnu ulogu u uočenoj razlici u vezi sa distribucijom ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (218, 219). Činjenicom da nije detektovana radioaktivnost u kostima, potvrđuje se da nije došlo do oslobađanja slobodnog $^{177}\text{Lu}^{3+}$ tj. da je ^{177}Lu -DMSA-SMNČ stabilan.



Slika 40. Snimci BALB/c miševa sa indukovanim tumorima snimljeni BRUKER® In vivo Extreeme II uređajem u različitim vremenskim intervalima: CT-26: a) 1. dan, b) 5. dana i c) 11. dana od i.t. injektovanja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ; 4T1: (d) 1. dana, (e) 5. dana i (f) 11. dana od i.t. injektovanja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ.

Nakon snimanja 1. i 14. dana od injektovanja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ, po tri BALB/c miša sa indukovanim CT-26 i 4T1 tumorima su žrtvovana. Izvađeni su organi od interesa i njihova radioaktivnost je izmerena u gama brojaču. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 41.



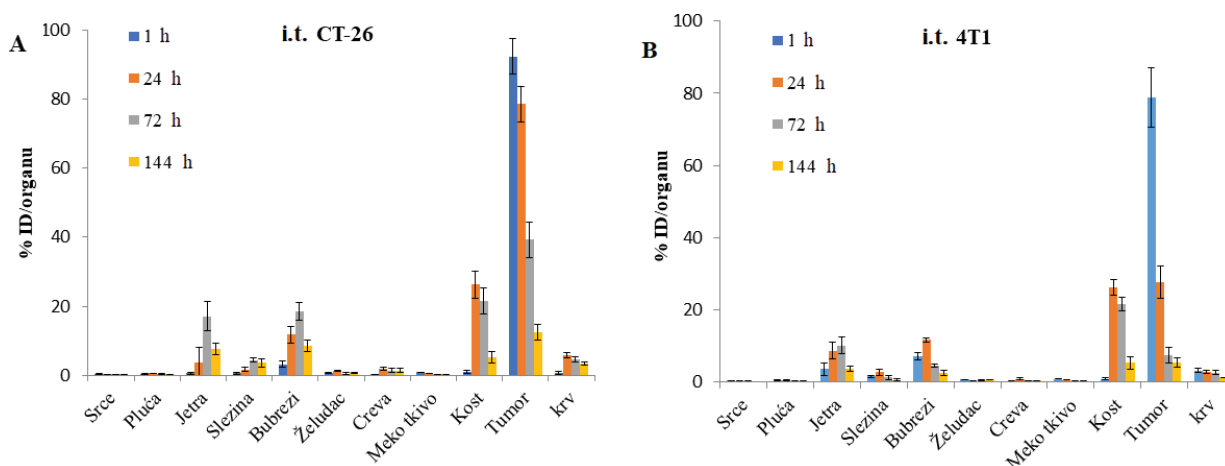
Slika 41. Biodistribucija ^{177}Lu -DMSA-SMNČ u tumoru i organima BALB/c miševa sa indukovanim CT-26 (A) i 4T1 (B) tumorima nakon i.t. injekcije. Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\bar{x} \pm \text{SD}$.

Iz rezultata prikazanih na slici 41A se može videti da se sva radioaktivnost nakon i.t. injekcije kod miševa sa ksenograftom CT-26 nalazi na mestu injektovanja tj. u tumorskom tkivu ($> 95\%$ ID) i 14. dana od injektovanja, dok je u ostalim tkivima i organima bila zanemarljiva. Ovako dobijeni rezultati nam ukazuju da se i.t. injektovanjem ^{177}Lu -DMSA-SMNČ kod miševa sa indukovanim ksenograftima CT-26 tumora značajno smanjilo neželjeno nakupljanje radioaktivnosti u zdravim tkivima i organima, za razliku od njihove i.v. primene.

Nasuprot ovim rezultatima, rezultati dobijeni nakon i.t. injekcije ^{177}Lu -DMSA-SMNČ miševima sa 4T1 ksenograftom pokazali su da je 14. dana od injektovanja došlo do značajnijeg oslobađanja radioaktivnosti sa mesta primene, a samim tim i distribucije radioaktivnosti u zdrave organe (jetru i slezinu) (Slici 41B). Radioaktivnost u tumorima se smanjila od 1. do 14. dana sa 92% na 72% ID, dok je radioaktivnost u jetri rasla tokom vremena: od $3,2\%$ ID nakon prvog dana do $19,8\%$ ID nakon 14. dana. Slično, radioaktivnost u slezini rasla je od prvog dana ($1,5\%$ ID) do 14. dana ($4,3\%$ ID). Radioaktivnost u ostalim organima je bila zanemarljiva.

Dobijeni rezultati izmerenih radioaktivnosti po organima BALB/c miševa sa indukovanim tumorima (CT-26 i 4T1) nakon žrtvovanja su u saglasnosti sa snimcima miševa prikazanim na slici 40.

Kao dokaz da biološko ponašanje primenjenih ^{177}Lu -DMSA-SMNČ u tumoru nakon i.t. injekcije zavisi od veličine čestica, kao i stabilnosti koordinativno kovalentne veze između grupa obloge na površini SMNČ i radionuklida, BALB/c miševima sa indukovanim ksenograftima obe ćelijske linije, i.t. je injektovan rastvor $^{177}\text{LuCl}$ ($\approx 0,5\text{MBq}/50\mu\text{l}$, $\text{pH} \approx 6,5$). Dobijeni rezultati prikazani su na slici 42.



Slika 42. Biodistribucija $^{177}\text{LuCl}_3$ u tumoru i organima BALB/c miševa sa indukovanim CT-26 (A) i 4T1 (B) tumorima nakon i.t. injekcije. Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\bar{x} \pm \text{SD}$ ($n=3$ po vrsti tumora).

Dobijeni rezultati pokazali su da se nakon i.t. injekcije rastvora $^{177}\text{LuCl}_3$ u CT-26 tumore, radioaktivnost iz njih očekivano sporije eliminiše nego iz 4T1 tumora, što se može objasniti prirodom i građom samih tumora. Takođe, usled male molekulske mase $^{177}\text{Lu}^{3+}$, lako difunduje kroz tkivo tumora i prelazi u krvne sudove, a samim tim i u sistemsku cirkulaciju. Nakon eliminacije $^{177}\text{Lu}^{3+}$ iz tumora, on se najviše nakuplja u kostima, jetri i bubrezima. Jetra i bubrezi su glavni putevi eliminacije $^{177}\text{Lu}^{3+}$ iz organizma (221).

S obzirom da se ^{177}Lu -DMSA-SMNC zahvaljujući svojoj veličini, primenjenoj oblozi i fizičko-hemijskim osobinama zadržava u tumorskom tkivu nakon i.t. injektovanja dovoljno dug vremenski period tako da emitovano zračenje može da ispolji svoj terapijski efekat, ispitivani agens se može smatrati potencijalnim radiofarmaceutskim lekom.

4.5. Terapijska efikasnost ^{177}Lu -DMSA-SMNC

Poslednjih godina, glavni trend u oblasti nuklearne medicine je personalizovana terapija, pri kojoj se farmaceutik i radionuklid za svakog pacijenta biraju ponaosob na osnovu tipa i stadijuma bolesti kao i njegovog celokupnog zdravstvenog stanja (222).

Personalizovana ciljana radionuklidna terapija zasniva se na specifičnom vezivanju i zadržavanju radiofarmaceutika u ciljnom tkivu (tumoru) i isporuci visoke doze zračenja koja dovodi do radijacionog oštećenja ćelija, sa najmanjim mogućim štetnim efektima po okolno zdravo tkivo i organizam u celini. Ovakav vid lečenja razlikuje se od često primenjivane, radioterapije, kod koje, pored dejstva na tumorske ćelije, jonizujuće zračenje deluje i na ćelije okolnog zdravog tkiva. Prema dosadašnjim saznanjima, ćelije zdravog tkiva otpornije su na dejstvo jonizujućeg zračenja od tumorskih ćelija koje se znatno brže dele. Upravo, ova razlika u osetljivosti između ćelija tumorskog i zdravog tkiva je jedan od osnovnih postulata na kome je osmišljen kompleksan način dejstva radioterapije i radionuklidne terapije.

Mehanizam dejstva zračenja, koje potiče od radionuklida koji je sastavni deo leka, leži u izazivanju radijacionog zapaljenja koje se završava nekrozom i fibrozom, pri čemu se tretirano tumorsko, proliferativno, hiperfunkcijsko i/ili hipermetaboličko tkivo smanjuje

(47). Za ovu svrhu najčešće se primenjuju radionuklidi koji emituju čestično zračenje (α - i β -emiteri). Domet emitovanih β -čestica u tkivima je i do nekoliko desetina milimetara u zavisnosti od njihove energije.

U praksi je dokazano da tokom intravenske primene radionuklida nije moguće izbeći ozračivanje zdravih tkiva i organa, što sa sobom nosi potencijalne rizike od razvoja novih, sekundarnih maligniteta. Kako bi se ovaj rizik sveo na najmanju moguću meru, poslednjih desetak godina su sprovedena brojna istraživanja uticaja drugih potencijalnih načina njihove primene u cilju smanjenja njihove sistemske raspodele. Jedan od načina, koji zaokuplja sve veću pažnju istraživača jeste lokalna primena radioobeleženih nanočestica direktno u tumorsko tkivo, odnosno intratumorska primena (223). Ovakav način primene u nuklearnoj medicini je poznat pod nazivom nanobrahiterapija i sličan je klasičnoj brahiterapiji. Cilj je da se na jedan daleko konforniji i bezbedniji način postigne željena efikasnost terapije, uz izbegavanje sistemskog ozračivanja zdravih organa ili tkiva, a ukoliko ga je nemoguće izbeći, da se onda svede na najmanju moguću meru.

U cilju boljeg razumevanja biološkog ponašanja sintetisanih ^{177}Lu -DMSA-SMNČ nakon njihove intratumorske primene, neophodno je bilo ispitati efekat zračenja na različite vrste tumora, koji će zavisiati ne samo od vrste zračenja već i od građe tumora.

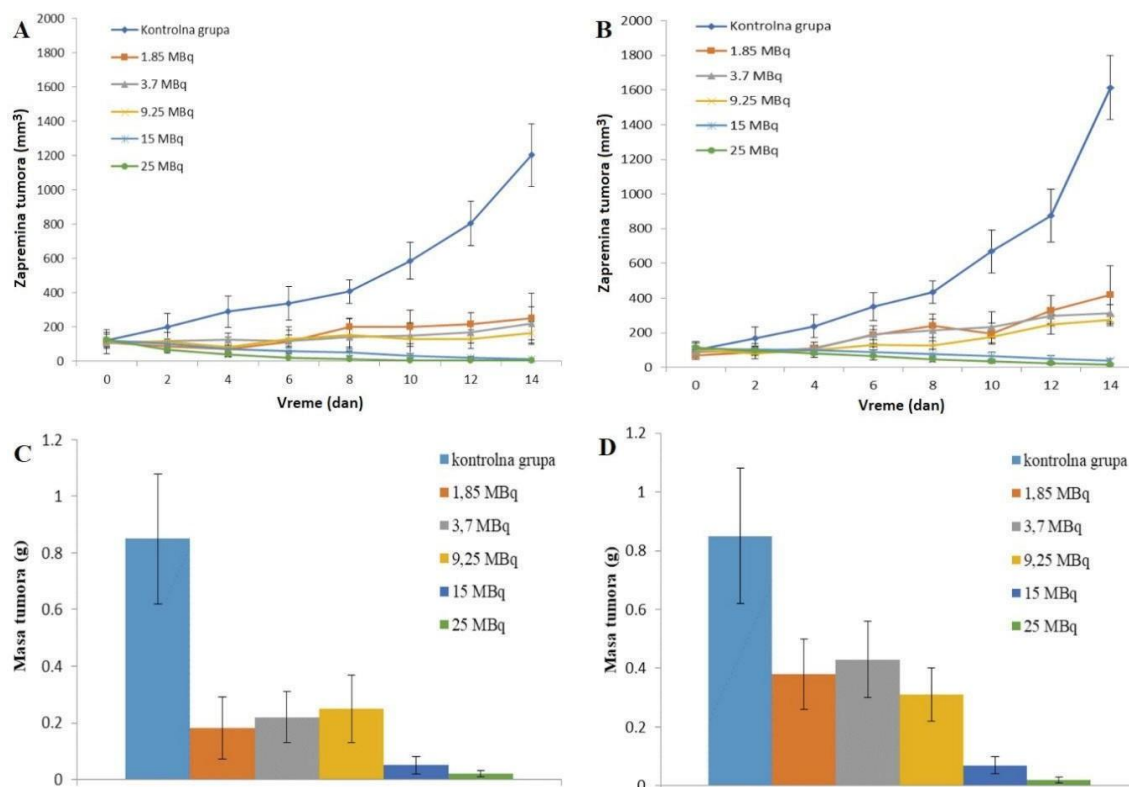
Osnovni parametar pri intratumorskoj primeni nanočestica koji utiče na efekat terapije je svakako mogućnost nanočestica da difunduju po tkivu tumora sa mesta injektovanja, što najviše zavisi od vrste tkiva iz kog tumor potiče, odnosno same unutrašnje strukture tumorskog tkiva. Idealan slučaj pri intratumorskom injektiranju je ravnomerna difuzija radioaktivno obeleženih nanočestica sa mesta injektovanja po celom tumoru i dovoljno dugo zadržavanje u tumorskom tkivu, bez značajne eliminacije u sistemske cirkulaciju tokom vremena trajanja terapije. Na taj način, lokalnim nakupljanjem nanočestica postiže se precizna lokalizacija radioterapijskog agensa, čime se smanjuje izlaganje zdravog tkiva zračenju, kao i u slučaju brahiterapije, ali za razliku od ove metode, radioobeležene nanočestice imaju mogućnost raspoređivanja po celom tumorskom tkivu putem difuzije, a sama metoda manje je invazivna (139).

U skladu sa tim, u ovoj disertaciji, ispitan je uticaj različitih doza zračenja, kao i uticaj početne veličine ksenografta na terapijsku efikasnost ^{177}Lu -DMSA-SMNČ. Kada se utvrđuje optimalna doza zračenja, ključno je pronaći balans između maksimalnog uništavanja tumora i minimalnog oštećenja zdravih tkiva. Ova odluka donosi se na osnovu različitih faktora, uključujući vrstu tumora, njegovu veličinu i lokaciju, kao i opšte zdravstveno stanje pacijenta.

Efikasnost terapije praćena je na BALB/c miševima sa indukovanim ksenograftima CT-26 i 4T1 tumora nakon i.t. injektiranja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ, izračunavanjem zapremine tumora svaki drugi dan i merenjem mase tumora na kraju eksperimenta. Sistemska toksičnost praćena je posmatranjem opšteg stanja ispitivanih eksperimentalnih životinja kao i merenjem njihove telesne mase svakog drugog dana tokom celog perioda trajanja eksperimenata.

4.5.1. Uticaj različitih doza zračenja na terapijsku efikasnost ^{177}Lu -DMSA-SMNČ

Terapijska efikasnost pet različitih doza ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (1,85; 3,7; 9,25; 15 i 25 MBq/100 μg /0,05 ml) praćena je nakon njihove intratumorske primene u BALB/c miševima sa indukovanim ksenograftima CT-26 i 4T1 tumora u toku 14 dana od dana injektovanja radioaktivnosti. Dobijeni rezultati poređeni su sa rastom tumora u kontrolnoj grupi, kojoj su i.t. injektovane neradioaktivne DMSA-SMNČ. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 43 (A, B, C, D).



Slika 43. Krive rasta tumora tokom perioda ispitivanja do 14. dana nakon i.t. injektovanja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ BALB/c miševima sa ksenograftima: A) CT-26 tumora, B) 4T1 tumora; mase tumora 14. dana od početka eksperimenta: C) CT-26 tumora i D) 4T1 tumora. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SD ($n = 6$ za svaku vrstu tumora i dozu zračenja).

Ksenografti obe kontrolne grupe obe ćelijske linije tumora (CT-26 i 4T1) rasli su progresivno i dostigli zapreminu veću od 1200 odnosno 1600 mm³ 14. dana od i.t. primene neradioaktivnih DMSA-SMNČ, što ukazuje da neradioaktivne DMSA-SMNČ čestice nemaju suprimirajući uticaj na rast tumora. Kao što se može videti iz prikazanih rezultata, kod obe vrste tumora, u odnosu na kontrolnu grupu, svih 5 injektovanih doza su do 4. dana imale suprimirajući efekat na rast tumora dok je razlika u procenjenoj zapremini tumora postala statistički značajna u odnosu na kontrolnu grupu već 6. dana od i.t. injekcije ^{177}Lu -DMSA-SMNČ ($p < 0,05$). Kod miševa sa ksenograftima CT-26 tumora, do kraja eksperimenta (do 14. dana) doze od 1,85; 3,7 i 9,25 MBq pokazale su suprimirajući efekat na rast tumora. Nije bilo statistički značajne razlike između njih u odnosu na terapijski efekat tj. zapreminu tumora ($p > 0,05$). Međutim, nakon i.t. primene doza od 15 i 25 MBq uočava se značajan terapijski efekat jer su ove doze dovele do potpune regresije rasta i uništenja tumora. Od šestog dana doze 15 i 25 MBq, u poređenju sa dozama od 1,85; 3,7 i 9,25 MBq pokazale su znatno veći uticaj na smanjenje zapremine tumora ($p < 0,05$). Između doza zračenja od 15 i 25 MBq nije bilo statistički značajne razlike u terapijskom efektu ($p > 0,05$), dok je između 9,25 i 15 MBq uočena statistički značajna razlika ($p < 0,05$) već od osmog dana od početka eksperimenta. Ovi rezultati pokazuju da je kod CT-26 tumora, u zavisnosti od očekivanog terapijskog efekta, najbolje primeniti dozu od 15 MBq. Veća doza, tj. doza od 25 MBq, nije poželjna jer može da dovede do povećanja doze zračenja koju primi okolno tkivo, a terapijski efekat nije statistički značajno veći od efekta doze od 15 MBq. Kod primene nižih doza, od 1,85; 3,7 i 9,25 MBq, najveće smanjenje zapremine tumora bilo

je nakon primene doze od 9,25 MBq. Na slici 43A se može uočiti, da nakon primene doze od 1,85 MBq dolazi do blagog porasta veličine tumora, jer je terapijski efekat dozno zavisian. Ova doza radioaktivnosti nije dovoljno visoka da onemogući dalji rast ćelija tumora koje nisu bile izložene bilo direktnim, indirektnim ili neciljanim (BE i CE) dejstvima zračenja. Visoke doze od 15 i 25 MBq dovele su do potpunog uništenja tumorskih ćelija. Kako je u tkivu tumora maksimalni domet beta čestica koje emituje ^{177}Lu oko 2 mm, samo direktno dejstvo zračenja ne može omogućiti željeni terapijski efekat. Pretpostavlja se da primenom ovih doza dolazi do potpunog uništenja tumora kombinacijom i direktnih i indirektnih i neciljanih (BE i CE) dejstava zračenja (27,30). Ovi rezultati su očekivani, uzimajući u obzir da ćelijska linija CT-26 spada u grupu neinvazivnih tumora koji ostaju *in situ*, na mestu primene, ne probijaju bazalnu membranu i nemaju metastatski potencijal.

Kod miševa sa ksenograftima 4T1 tumora, dobijeni su slični rezultati nakon primene svih 5 injektovanih doza ^{177}Lu -DMSA-SMNC, kao kod CT-26 tumora (slika 43B). Doze od 1,85, 3,7 i 9,25 MBq su pokazale suprimirajući efekat na rast tumora u odnosu na kontrolnu grupu, međutim od 10. do 14. dana od injektovanja ^{177}Lu -DMSA-SMNC, uočava se porast zapremine tumora nakon primene ovih doza, tj. 1,85 MBq (od 194,11 do 419,32 mm³), 3,7 MBq (od 231,00 do 312,55 mm³) i 9,25 MBq (od 173,76 do 273,30 mm³). Pretpostavlja se da su kod ove vrste tumora, usled njegovog agresivnog rasta i velikog potencijala za brzo napredovanje bolesti, ćelije koje nisu primile dozu zračenja ili su primile jako malu dozu zračenja, nastavile agresivno da rastu. Očekuje se da će kod ove vrste tumora primena nekoliko nižih ponovljenih doza (bilo 1,85, bilo 3,7 ili 9,25 MBq) u određenom vremenskom intervalu od primene početne doze sporije ili brže dovesti do uništenja tumora. Međutim, primena visokih doza od 15 i 25 MBq dovodi do njihovog uništenja kombinacijom direktnih, indirektnih i neciljanih (BE i CE) dejstava zračenja.

Dokazano je da je ^{177}Lu , zahvaljujući svojim povoljnim fizičkim karakteristikama, jedan od radionuklida izbora za obeležavanje nanočestica za primenu u nanobrahiterapiji. Njegova primena omogućava nizak nivo izloženosti zračenju zdravih organa i tkiva, tako da se ne očekuje opšta ili tkivno specifična toksičnost. Dobijeni rezultati terapijske efikasnosti ^{177}Lu -DMSA-SMNC u skladu su sa rezultatima sličnih istraživanja u kojima je korišćen isti radionuklid, ^{177}Lu (224,225).

U velikom broju studija, na modelu eksperimentalnih životinja poput miševa i pasa, ispitivan je i.t. način primene zračenja (140). Ispitivani su efekti nanobrahiterapije korišćenjem ^{177}Lu , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{188}Re , ^{103}Pd i ^{198}Au na *in vitro* ili *in vivo* modelima. U ispitivanjima su korišćene nanočestice različitih struktura (na bazi gvožđa, srebra, zlata) i veličina, funkcionalizovanih oblogama poput PEG, arapske gume i drugih, sa helatorom (DTPA, DOTA, TADOTAGA) ili bez njega, sa različitim antitelima (najčešće korišćen je trastuzumab) ili bez njih. Veličine ispitivanih nanočestica su se kretale u rasponu od 5 nm do preko 100 nm. Takođe, u eksperimentima su korišćene različite doze zračenja, od 0,5 MBq do 50 MBq (139,232–234).

Terapijski efekat zračenja može se objasniti, između ostalog i teorijom mete. Teorija mete je klasična teorija koja podrazumeva da ćelija mora biti direktno pogođena zračenjem da bi došlo do terapijskog efekta. Međutim, u poslednje dve decenije velika pažnja se poklanja BE, CE i ulozi imunskog sistema u terapijskom efektu zračenja, koji je doveo do revolucije na polju radiobiologije (226,227) (228). Izvesno je da dejstvo jonizujućeg zračenja nije samo lokalnog karaktera već i da dovodi do sistemskog efekta aktivirajući brojne signalne

puteve (229). Prema ovoj teoriji, ozračene ćelije, sintezom i otpuštanjem brojnih medijatora, utiču na neozračene ćelije koje se nalaze u njihovoj blizini, u dometu od nekoliko mm, dovodeći do oštećenja DNK u njima (BE). Takođe, usled postojanja ćelijskih komunikacija unutar ozračenog tumora, ćelije koje su primile višu dozu zračenja emituju signale koji utiču na ćelije koje su primile nisku dozu, kao i obrnuto (CE). *Laohoubu i saradnici* su 2019. godine došli do zaključka u svojim eksperimentima sa ^{212}Pd vezanog za karcinoembrionalna antitela (CEA), da je terapijski efekat zračenja prisutan nezavisno od apsorbovane doze. Oštećenja DNK su potvrđena i u ozračenim i u neozračenim ćelijama, tj. oštećenja su bila homogeno raširena po celom tumorskom tkivu. Ovo je bilo neočekivano s obzirom da, prema tadašnjim saznanjima, akutno oštećenje ćelija bi trebalo da bude u korelaciji sa ozračenom regijom tumora i sa apsorbovanom dozom, dok u neozračenim regijama tumora ne bi trebalo da dođe do oštećenja ćelija.

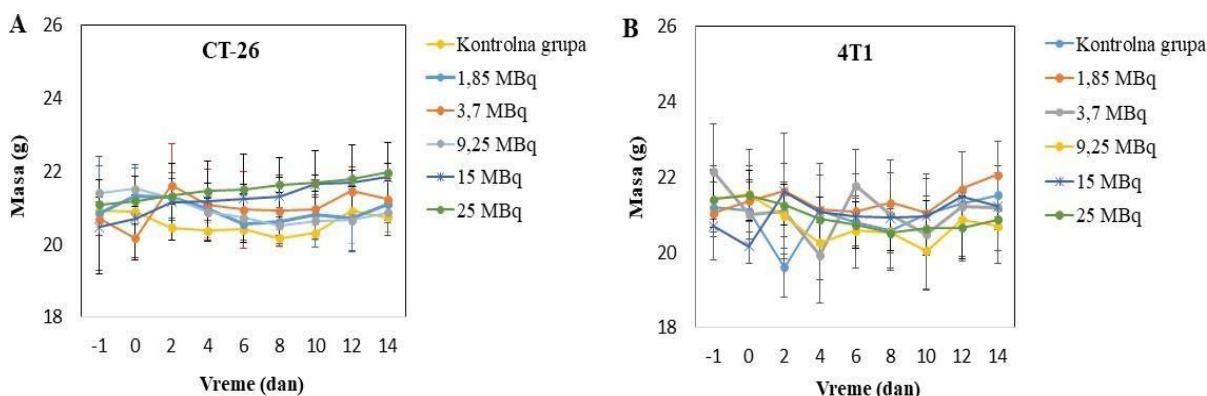
Rezultati naših istraživanja u skladu su sa rezultatima drugih autora. *Khan i saradnici* su 2008. godine, ispitujući efikasnost dve doze (od 1,3 i 2,7 MBq) i.t. injektovanih nanočestica obeleženih radioaktivnim ^{198}Au , zaključili da postoji dozna zavisnost u postignutom efektu na ksenograftu B16F10 melanoma na C57BL miševima. Primenjena doza od 2,7 MBq je značajno usporila rast tretiranih tumora. Tokom 8 dana, zapremina tretiranih tumora bila je za 45% niža u odnosu na kontrolnu grupu (230).

Poredeći efikasnost i.t. injektovanih doza od 2 i 25 MBq ^{131}I u vidu “injektabilne brahiterapije”, *Hruby i saradnici* došli su do zaključka da je terapija takođe bila dozno zavisna. Dok je niža primenjena doza samo suprimirala rast tumora, doza od 25 MBq ^{131}I tokom 50 dana dovela je do potpune regresije tumora. Između ove dve injektirane doze, razlika u veličini tumora je postala statistički značajna oko 16. dana lečenja (231).

Ispitujući uticaj tri doze (2, 5 i 10 MBq) ^{198}Au obeleženih nanočestica na melanom u trajanju od 14 dana, *Chakravarty i saradnici* došli su do zaključka da je antitumorski efekat takođe dozno zavisna. Dok je doza od 2 MBq samo suprimirala rast tumora u odnosu na kontrolne grupe, doze od 5 i 10 MBq su dovele do potpune regresije tumora (232).

4.5.2. Ispitivanje toksičnosti ^{177}Lu -DMSA-SMNČ

Ispitivanju toksičnosti injektovanih ^{177}Lu -DMSA-SMNČ, praćeno je svakog drugog dana merenjem telesne mase svih miševa uključenih u istraživanje i posmatrano je njihovo opšte stanje. Dobijeni rezultati pokazuju da nije bilo statistički značajne razlike u masi između kontrolne grupe i grupa koje su primile različite doze ^{177}Lu -DMSA-SMNČ ($p > 0,05$) kod miševa sa ksenograftima obe vrste tumora. Gubitak telesne mase iznad 20% predstavlja kriterijum sistemske toksičnosti (235,236). Prosečan gubitak telesne mase svih merenih miševa bio je značajno ispod 20%. Na osnovu ovoga se može zaključiti da ispitivane ^{177}Lu -DMSA-SMNČ nisu dovele do ispoljavanja toksičnih efekata ni u jednoj od ispitivanih grupa miševa, niti kod bilo koje primenjene doze, kako je prikazano na slici 44 (A, B).

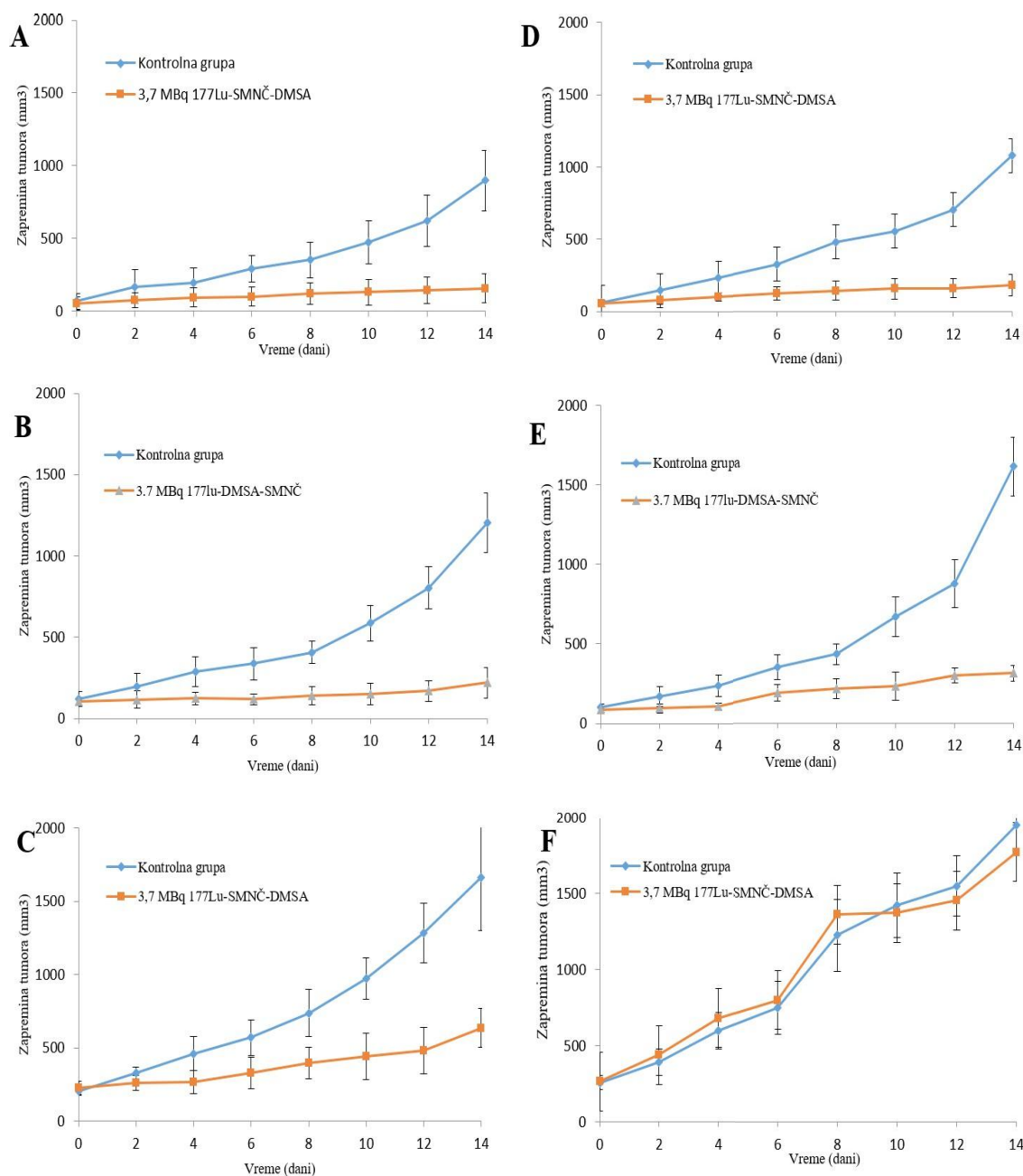


Slika 44. Telesne mase BALB/c miševa sa ksenograftima: A) CT-26 tumora, B) 4T1 tumora u toku 14 dana od početka eksperimenta ($\pm$ SD, $n=6$).

Dobijeni rezultati u skladu su sa literaturnim podacima za SMNČ. U studijama toksičnosti za SMNČ na bazi Fe_3O_4 ustanovljeno je da doza od 3150 mg/kg nakon i.t. primene u miša ne dovodi do toksičnih efekata, a LD_{50} je 4410 mg/kg (237). Pošto je prosečna masa miševa 21 g, maksimalna doza SMNČ koja se može primeniti iznosi 66,15 mg. Ova doza je višestruko veća od injektovane količine SMNČ u našim istraživanjima (0,1 mg/mišu). Prema literaturnim podacima, u kliničkoj primeni SMNČ za terapiju glioblastoma, koncentracija SMNČ koja se injektuje u tumorsku leziju iznosi 31,36 mg SMNČ/ cm^3 lezije (238). Kako je u našim ispitivanjima primenjena mnogo manja količina SMNČ po mišu i po zapremini tumora ($100 \mu\text{g}/125 \text{ cm}^3$), nisu određivani hematološki parametri, parametri jetre (PV, aPTV, TV, ALT, AST), kao ni parametri toksičnosti primenjenog agensa (285). Netoksičnost SMNČ obeleženih ^{177}Lu pokazala je i studija *Salvanou i saradnika* (221).

4.5.3. Uticaj veličine ksenografta na efikasnost terapije ^{177}Lu -DMSA-SMNČ

Uticaj veličine tumora na terapijsku efikasnost ^{177}Lu -DMSA-SMNČ određen je merenjem veličine i izračunavanjem zapremine ksenografta kod BALB/c miševa sa ksenograftima CT-26 i 4T1 tumora, u toku 14 dana od i.t. injekcije 3,7 MBq / 0,1 mg/ 0,05 ml ^{177}Lu -DMSA-SMNČ. Kontrolnim grupama su i.t. injektovane neradioaktivne, DMSA-SMNČ (0,1 mg/ 0,05 ml). Dobijeni rezultati predstavljeni su na slici 45.



Slika 45. Krive rasta tumora nakon i.t. injektovanja ¹⁷⁷Lu-DMSA-SMNČ BALB/c miševima sa ksenograftima: CT-26 tumora početne veličine: A) 45-75 mm³, B) 100-150 mm³ i C) 200-300 mm³; 4T1 tumora; početne veličine: D) 45-75 mm³, E) 100-150 mm³ i F) 200-300 mm³. Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost ± SD (n = 6 za svaku vrstu i početnu veličinu tumora).

Kod miševa sa CT-26 ksenograftima tumora, dobijeni rezultati pokazuju veliku terapijsku efikasnost ¹⁷⁷Lu-DMSA-SMNČ, koja je nezavisna od početne zapremine tumora (Slika 45, A), B), C)). U prva četiri dana od i.t. primene ¹⁷⁷Lu-DMSA-SMNČ nije bilo statistički značajne razlike u veličini tumora tretiranih grupa u poređenju sa kontrolnim grupama ($p > 0,05$). Nakon šestog dana od i.t. injektovanja radioobeleženih čestica razlika u veličini tumora bila je statistički značajna ($p < 0,05$). Na kraju perioda opservacije (14. dan od i.t. injekcije), prosečne veličine tumora svih tretiranih grupa bile su višestruko manje

od veličine tumora u kontrolnim grupama, bez obzira na početnu veličinu tumora. Smatra se da je β -zračenje ^{177}Lu dovelo do nekroze i samim tim inhibicije rasta tumora u svim tretiranim grupama. U kontrolnoj grupi, rast tumora bio je kontinuiran. Dobijeni rezultati terapijske efikasnosti ^{177}Lu -DMSA-SMNČ u skladu su sa rezultatima sličnih studija u kojima je korišćen ^{177}Lu (224,225).

Nasuprot tome, kod 4T1 tumora, terapijska efikasnost ^{177}Lu -DMSA-SMNČ zavisila je od njihove početne veličine. Naime, primenjena doza zračenja značajno je suprimirala rast malih ($45\text{--}75\text{ mm}^3$) i srednjih ($100\text{--}150\text{ mm}^3$) tumora u odnosu na rast kontrolne grupe. Međutim kod tumora velikih početnih veličina ($200\text{--}300\text{ mm}^3$) primenjena doza zračenja nije imala suprimirajući uticaj na rast, tj. nije bilo statistički značajne razlike u veličini tumora tretirane grupe u odnosu na kontrolnu grupu ($p>0,05$) (Slika 45. D), E), F)). Razlika u efikasnosti terapije velikih CT-26 i 4T1 tumora se objašnjava razlikama u nivoima biološke invazivnosti tj. agresivnosti rasta. Za razliku od CT-26 tumora, 4T1 tumori pokazuju izuzetno visok nivo biološke invazivnosti tj. agresivnog rasta i velikog potencijala za brzo napredovanje bolesti.

S obzirom da vreme poluraspada ^{177}Lu iznosi 6,7 dana, a da tumori iz kontrolnih grupa obe vrste tumora ne bi prešli etički dozvoljenu granicu od 2000 mm^3 , eksperiment je prekinut nakon 14 dana, kod oba tipa ksenografta, i sve eksperimentalne životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom.

Rezultati ovog istraživanja još jednom upućuju na zaključak da je u zavisnosti od vrste tumora, veoma važno lečenje tumora započeti u ranoj fazi, kada je veličina tumora manja i dok nije došlo do lokalnog ili udaljenog metastatskog širenja.

Prema literaturnim podacima, veliki broj lekova na bazi nanočestica danas se ispituje upravo za primenu putem intratumorske injekcije. Iako je intravenska primena mnogo konforniji način primene, lokalna primena ima prednosti jer se na taj način, između ostalog, zaobilazi opasnost od nastanka ozbiljnih neželjenih efekata kao što je npr. citokinska oluja (239).

Na osnovu dobijenih rezultata, ^{177}Lu -DMSA-SMNČ se može smatrati potencijalnim nanobrahiterapijskim agensom. Kako klasična brahiterapija predstavlja invazivan metod lečenja (240), koji sa sobom nosi brojne rizike po pacijenta, smatra se da primena radioobeleženih biokompatibilnih nanočestica, ima izvesnih sličnosti, ali i značajnih prednosti. Prednost je ta što se ove radioobeležene nanočestice injektuju u tumor putem injekcije, tako da je ovaj metod mnogo manje invazivan od klasične brahiterapije tokom koje se koriste specijalni kateteri ili aplikatori. Takođe, jednom kada se injektuju, radioobeležene nanočestice ostaju u tumorskom tkivu dok se ne razgrade, te nije potrebno hiruško odstranjivanje izvora zračenja kao kod brahiterapije.

U odnosu na ciljanu radionuklidnu terapiju, primenjenu sistemski (najčešće i.v.), prednost je što radioaktivnost ostaje na mestu injektovanja, ne eliminiše se, pa ne dolazi do neželjenih efekata zračenja u zdravim organima i tkivima. Ova činjenica je od velike važnosti budući da neželjeni efekti mogu predstavljati ograničavajući faktor od koga zavisi nastavak terapije (npr. ^{90}Y -DOTATATE je nefrotoksičan) (241).

4.6. PATOHISTOLOŠKA ANALIZA

Dugi niz godina, karcinom dojke predstavlja drugi vodeći uzrok smrti od karcinoma kod žena širom sveta. Iako su učinjena značajna poboljšanja u dijagnostici i lečenju karcinoma dojke, rano otkrivanje i inhibicija njegovog metastatskog širenja i dalje predstavljaju ključni izazov.

Pretkliničke studije korišćenjem 4T1 metastatskog mišjeg singenog modela mogu doprineti boljem razumevanju biologije karcinoma dojke, uključujući mehanizme progresije karcinoma, invazivnosti i metastaza, kao i za testiranje novih terapijskih pristupa, uključujući hemioterapiju, terapiju zračenjem i imunoterapiju, kao i za razvoj novih lekova za lečenje karcinoma dojke. Takođe, ova ćelijska linija otporna je na mnoge najčešće korišćene hemioterapijske agense, što omogućava istraživačima da testiraju nove tretmane koji mogu biti efikasniji protiv tumora otpornih na lekove. 4T1 tumorogena epitelna ćelijska linija potiče od tumora mlečne žlezde miša i rezistentna je na 6-tioguanin (170). Prema literaturnim podacima, kada se injektuje u BALB/c miševе, kod kojih je potpuno funkcionalan imunski sistem, ćelijska linija 4T1 može spontano metastazirati u pluća, kosti i jetru i formirati vidljive metastatske depozite u ovim organima. Ova linija posebno je korisna za istraživanje karcinoma dojke stadijuma IV kod ljudi, jer tumor iz ove ćelijske linije oponaša ljudski karcinom dojke i lako metastazira u miševima, čineći ih odgovarajućim modelom za karcinom dojke. *Liu i saradnici* (2014) koristili su ortotopski 4T1 singeni mišji model da bi pokazali da inhibicija Fas signalne kaskade usporava metastaziranje i rast tumora i smanjuje zapaljenjske procese uključene u razvoj ovog tumora, čime se uspostavlja Fas signalizacija kao potencijalni terapijski cilj (242). *Aceto i saradnici* su 2014. godine koristili model 4T1 singenog mišjeg ksenografta da pokažu da cirkulišući klasteri tumorskih ćelija (CTC klasteri) prisutni u krvi pacijenata obolelih od karcinoma potiču od primarnih tumora i u velikoj meri doprinose metastatskom širenju karcinoma (243). *Gao i saradnici* koristili su mišji 4T1 model da testiraju rast karcinoma dojke i metastaze nakon tretmana doksorubicinom (DOX) isporučenim putem micela zavisnih od pH vrednosti (244). Otkrili su da se primenom polimernih micela formiranih i sa poli(L-laktidom) (PLLA) (Mn 3000)-b-poli-etilen glikolom) (PEG) (Mn 2000)-folatom i poli(L-histidinom) (PHis) (Mn 4700)-b-PEG (Mn 2000), i sa inkorporiranim DOX-om, sprečava rast i metastaziranje tumora, čime se potvrđuje da je to novi metod za sigurniju isporuku poznatog citostatika. Ćelijska linija 4T1 se rutinski koristi za razvoj ksenografta kod 4T1 singenog modela miša. Nakon implantacije, proizvodnja faktora stimulacije kolonija, citokina, hemokina i faktora angiogeneze omogućava 4T1 tumorskim ćelijama da brzo metastaziraju. Metastatski model 4T1 omogućava proučavanje terapijskih lekova za karcinom dojke u kasnoj fazi.

Uprkos kontinuiranom napretku i brojnim terapijskim pristupima, kolorektalni karcinom često je otporan na kombinovanu hemioterapiju, što naglašava potrebu za razvojem potencijalnih novih strategija lečenja. CT-26 je N-nitrozo-N-metiluretan-(NNMU) indukovana nediferencirana ćelijska linija karcinoma debelog creva otkrivena kod BALB/c miševa sa agresivnim karcinomom debelog creva. Ćelije ove ćelijske linije su adherirajuće i imaju morfologiju fibroblasta (245).

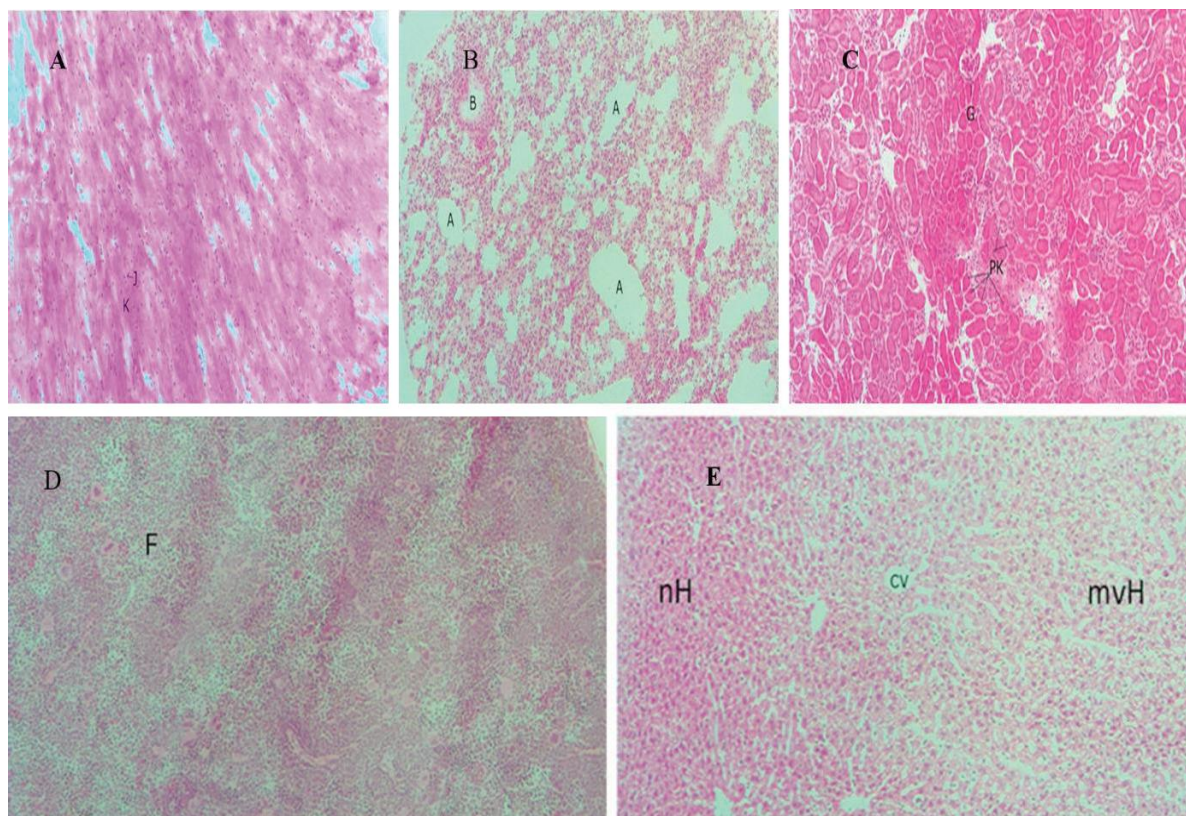
Modeli ksenografta u velikoj meri su korišćeni od 1960-ih i ostaju najčešće korišćeni životinjski modeli za razvoj lekova za tretman karcinoma. Ovi modeli su od suštinskog značaja za procenu efikasnosti novih lekova u lečenju ljudi sa tumorima. *Lechner i saradnici* (2013) su koristili CT-26 za proučavanje imunskog profila karcinoma debelog creva kako bi identifikovali nova ciljna mesta dejstva terapijskih agenasa (246). Oni su proučavali pomoćne T-ćelije, markere imunosupresije, citotoksične T-ćelije i zrele dendritske ćelije i

zaključili da je moguće koristiti imunski profil za identifikaciju pacijenata koji mogu najbolje reagovati na imunoterapijski tretman. Zhao i saradnici su 2017. godine koristili CT-26 kao model kolorektalnog karcinoma za poboljšanje strategija imunoterapije. Razvili su novi ortotopski mišji model tumora koji je rezultirao indukcijom T ćelija koje infiltriraju tumor, NK ćelija i B ćelija, kao i povećanim nivoima imunostimulišućih citokina (interleukin 2 i 6, interferon-gama i granzim B) i nižim nivoom imunosupresivnih mijeloidnih ćelija (247). Radioterapija je tipičan adjuvantni tretman nakon operacije ili hemioterapije kod bolesnika sa kolorektalnim karcinomom visokog stadijuma (248). Međutim, dokazano je da su kolorektalni karcinomi izrazito radiosenzitivni (249). Stoga su neophodni novi pristupi kako bi se poboljšala efikasnost tretmana zračenjem.

Patohistološka analiza igra važnu ulogu u identifikaciji tumora, utvrđivanju stadijuma tumora i stepena diferencijacije, kao i razumevanju njihovih molekularnih karakteristika. Ovom analizom moguće je proučavanje ćelijske strukture i organizacije tumora pod mikroskopom.

U cilju razumevanja terapijskog efekata ^{177}Lu -DMSA-SMNČ, kao potencijalnog nanobrahiterapijskog agensa, nakon njegove i.t. primene u ksenografte CT-26 i 4T1 tumora kod Balb/c miševa, posebna pažnja bila je usmerena ka patohistološkoj analizi tumorskog tkiva i organa od interesa. Miševi su žrtvovani 14. dana od injektovanja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ. Nakon žrtvovanja životinja, organi su prvo makroskopski pregledani, radi utvrđivanja eventualnih metastaza vidljivih golim okom. Tokom makroskopskog pregleda, prisustvo metastaza nije uočeno ni kod životinja sa ksenograftima CT-26 ni 4T1 tumora, niti tokom naknadne analize patohistoloških preparata bojenih standardnom metodom HE. Na pregledanim organima, kao što su srce, pluća, bubreg, slezina i jetra, nisu uočena prisustva mikroskopskih metastatskih depozita koji potiču od ispitivanih tumora.

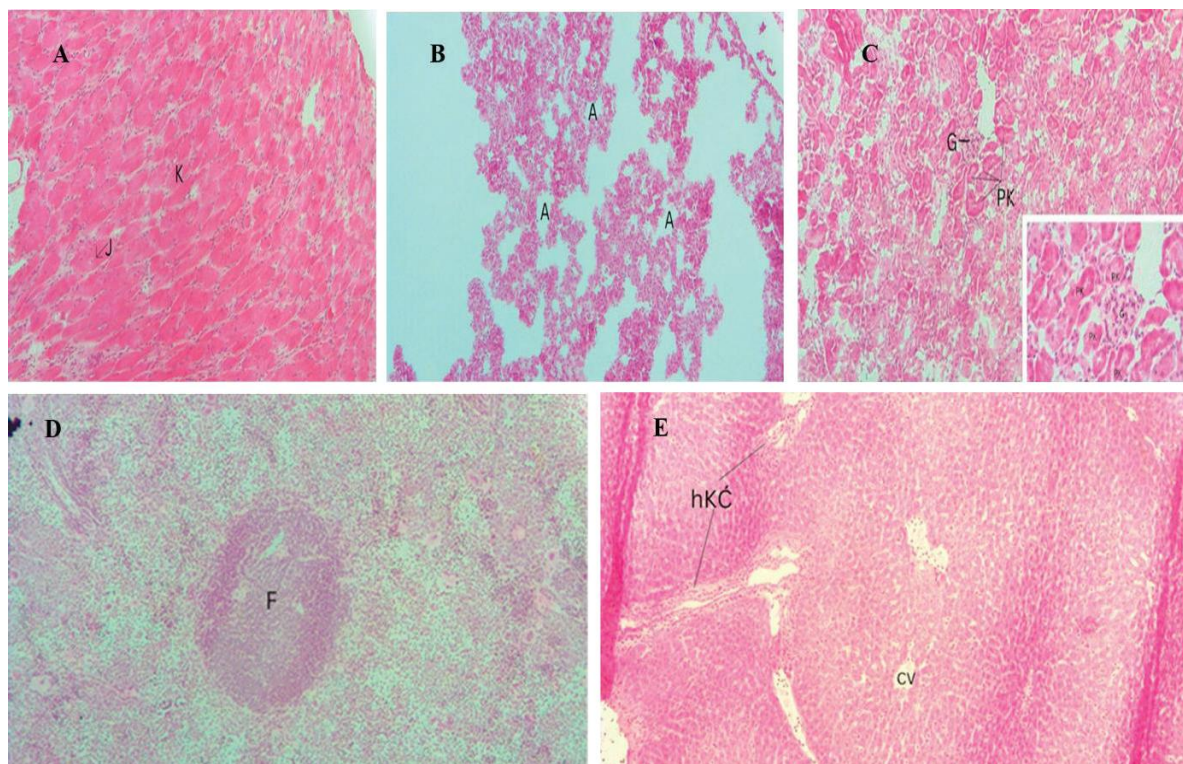
Za razliku od CT-26 ćelijske linije koja ima nizak metastatski potencijal u eksperimentalnom modelu miša, 4T1 ćelijska linija veoma lako metastazira u jetru i pluća. Kako nisu uočena prisustva mikroskopskih udaljenih metastatskih depozita ni u jednom organu nakon subkutanog injektovanja CT-26 i 4T1 ćelijskih linija i nakon i.t. primene 25 MBq ^{177}Lu -DMSA-SMNČ, smatramo da je metastatski potencijal ovih ćelija u ksenograftu (koji obuhvata pokretljivost, sposobnost invazije i ulaska u krvne sudove, sposobnost preživljavanja u cirkulaciji, sposobnost deobe i rasta na udaljenim mestima), značajno smanjen dejstvom zračenja. Takođe se pretpostavlja da se ćelije koje su tokom razvoja ksenografta i nakon primene zračenja metastazirale, da se nalaze u neaktivnom, pritajenom stanju, bilo zbog akvitanije imunskog odgovora BALB/c miša, bilo zbog zračenjem indukovano apskopalnog efekta.



Slika 46. Reprezentativne mikrofotografije organa od interesa BALB/c miševa sa ksenograftima CT-26 tumora, 14. dana od i.t. primene 25 MBq ^{177}Lu -DMSA-SMNČ; HE bojenje (100x). A Srce, B. Pluća, C. Bubreg D. Slezina, E. Jetra

A. Srce: očuvana histomorfologija miokarda sa jasno vidljivim kardiomiocitima (K) i očuvanim jedrima (J); B. Pluća: očuvana histomorfologija pluća sa jasno vidljivim alveolama (A) i bronhom (B); C. Bubreg: očuvana histomorfologija bubrega sa jasno vidljivim glomerulima (G) i proksimalnim, savijenim kanalićima (PK); D. Slezina: očuvana histomorfologija slezine sa brojnim folikulima (F); E. Jetra: očuvana histomorfologija jetre sa centralnom venom (CV) u sredini lobulusa i očuvanim hepatocitima (nH) levo; mikrovezikularna masna promena (mvH) desno.

Rezultati prikazani na reprezentativnim mikrofotografijama organa od interesa BALB/c miševa sa ksenograftima CT-26 i 4T1 tumora u skladu su sa literaturnim podacima. Podaci iz eksperimenata na miševima, pacovima i zečevima pokazuju da se najveća količina i.v. injektovanog ^{177}Lu , deponuje u kostima, a male količine se eliminišu putem bubrega i jetre (250). U tim organima ^{177}Lu se raspada u skladu sa svojim vremenom poluraspada i selektivno ozračuje te organe. Pokazalo se da su promene u bubrezima i jetri izazvane zračenjem reverzibilne (251).

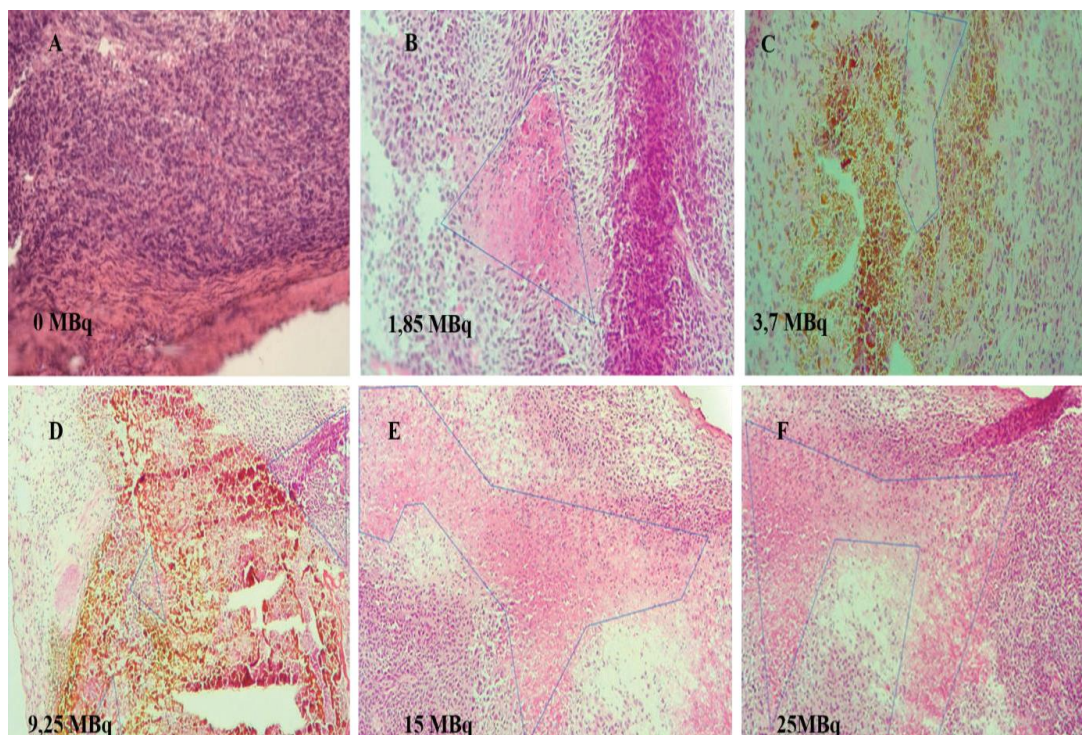


Slika 47. Reprezentativne mikrofotografije organa od interesa BALB/c miševa sa ksenograftima 4T1 tumora, 14. dana od i.t. primene 25 MBq ^{177}Lu -DMSA-SMNČ; HE bojenje (100x). A Srce, B. Pluća, C. Bubrezi, D. Slezina, E. Jetra.

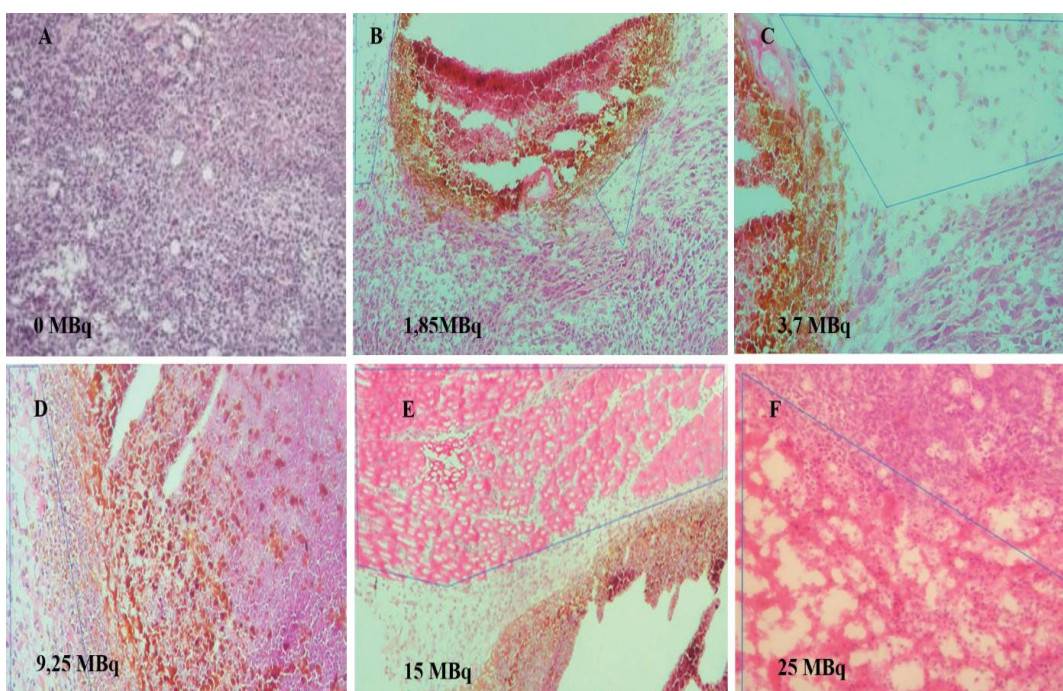
A. Srce: očuvana histomorfologija miokarda sa jasno vidljivim kardiomiocitima (K) i očuvanim jedrima (J); B. Pluća: očuvana histomorfologija pluća sa jasno vidljivim alveolama (A); C. Bubrezi: umereno izražena parenhimatozna degeneracija epitelnih ćelija koje oblažu proksimalne savijene kanaliće (PK) i očuvana histomorfologija glomerula (G), (HE, 100x; dole desno - detalj sa slike 400x); D. Slezina: očuvana histomorfologija slezine sa brojnim folikulima (F); E. Jetra: očuvana histomorfologija jetre sa centralnom venom (CV) u sredini lobulusa i hiperplazijom Kupferovih ćelija (hKČ)

Prikazani rezultati na slikama 46 i 47 u skladu su sa rezultatima prikazanim na slici 41. Reprezentativne mikrofotografije organa od interesa BALB/c miševa sa ksenograftima CT-26 tumora pokazale su da ne postoje promene ni u jednom od prikazanih organa, jer se sva radioaktivnost nakon intratumorske injekcije nalazi na mestu injektovanja tj. u tumorskom tkivu ($> 95\%$ ID) i do 14. dana od injektovanja. Za razliku od njih, kod BALB/c miševa sa ksenograftima 4T1 tumora, dolazi do značajnijeg oslobađanja radioaktivnosti sa mesta primene (iz tumora), a samim tim i distribucije radioaktivnosti u zdrave organe (jetru i slezinu). Dok se kod histološkog pregleda slezine ne uočavaju neželjeni efekti zračenja, u jetri se uočava da dolazi do hiperplazije Kupferovih ćelija. Kako se ^{177}Lu eliminiše putem bubrega, u njima se uočava umereno izražena parenhimatozna degeneracija epitelnih ćelija koje oblažu proksimalne savijene kanaliće. Kao što je već rečeno, ove promene su reverzibilne prirode. Traju samo dok je zračenje prisutno, a nakon toga nestaju (251). Mali domet β -čestica i skoro potpuno preuzimanje ^{177}Lu od strane ovih organa dovodi do zanemarljivog efekta zračenja na ostala tkiva i organe. Kako su promene na jetri i bubrezima reverzibilne, a patohistološkim ispitivanjem nisu uočene nikakve patološke promene na ostalim organima od interesa, smatra se da je, sa stanovišta zaštite od zračenja, i.t. primena ^{177}Lu -DMSA-SMNČ značajno bezbednija od njegove intravenske primene.

Na slikama 48 i 49 su prikazane reprezentativne mikrofotografije CT-26 i 4T1 tumora nakon i.t. primene svih pet ispitivanih doza ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (1,85; 3,7; 9,25, 15 i 25 MBq).



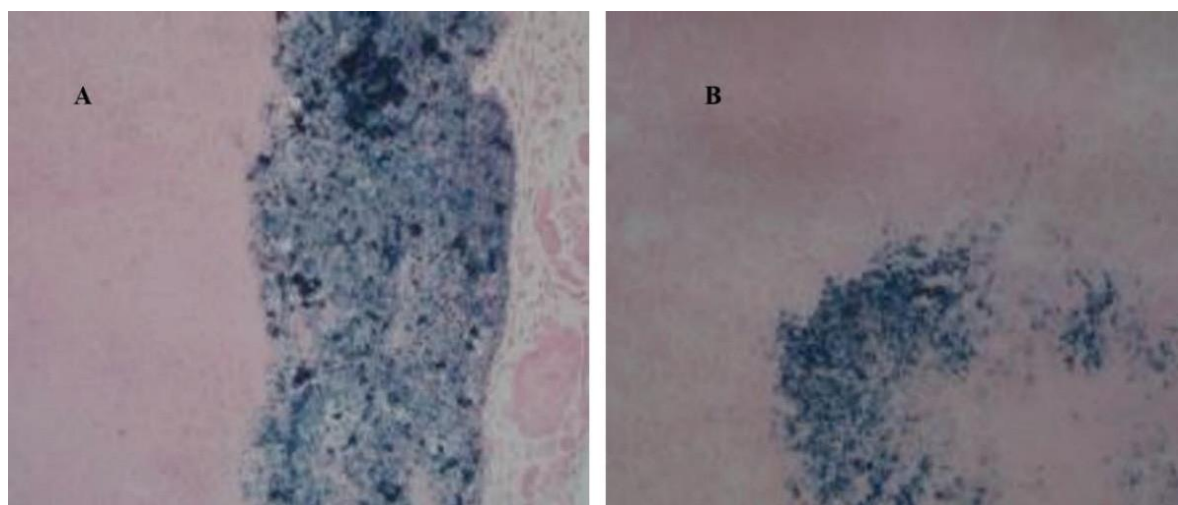
Slika 48. Reprezentativne mikrofotografije **CT-26** tumora nakon i.t. primene ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (HE bojenje). **A.** Kontrolna grupa, 0 MBq, (200x) **B.** 1,85 MBq, diskretna nekroza (oivičeno plavim) (200X). **C.** 3,7 MBq, diskretna nekroza (oivičeno plavim) (200X). **D.** 9,25 MBq, umerena nekroza (oivičeno plavim) (100X). **E.** 15 MBq, izražena nekroza (oivičeno plavim) (100X). **F.** 25 MBq, izražena nekroza (oivičeno plavim) (200X).



Slika 49. Reprezentativne mikrofotografije **4T1** tumora nakon i.t. primene ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (HE bojenje). **A.** Kontrolna grupa, 0 MBq (400x) **B.** 1,85 MBq, diskretna nekroza (oivičeno plavim) (100X). **C.** 3,7 MBq, diskretna nekroza (oivičeno plavim) (200X). **D.** 9,25 MBq, umerena nekroza (oivičeno plavim) (200X). **E.** 15 MBq, izražena nekroza (oivičeno plavim) (100X). **F.** 25 MBq, izražena nekroza (oivičeno plavim), (200x).

Patohistološkim pregledom isečaka tumorskog tkiva kontrolne grupe utvrđeno je da se tkivo CT-26 tumorskog ksenografa sastoji od zbijenih i homogeno dispergovanih polimorfnih tumorskih ćelija sa okruglim do ovalnim jedrima oko kojih je blago bazofilna citoplazma. Ovu vrstu tumora karakteriše slaba vaskularizacija, tj. tumor difuzijom dobija sve materije koje su mu neophodne za rast.

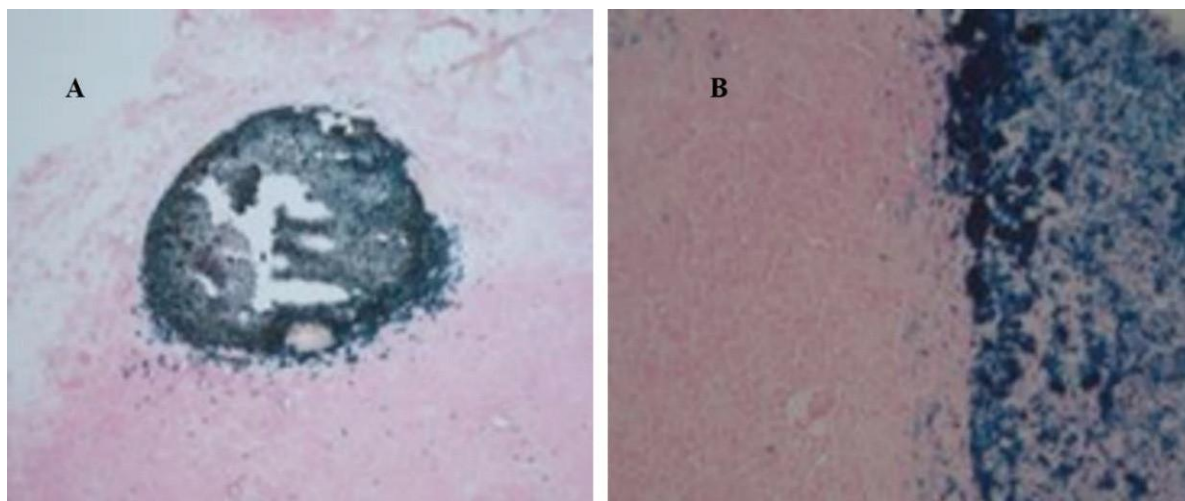
Patohistološka analiza tumorskog tkiva svih pet tretiranih grupa eksperimentalnih životinja (1,85; 3,7; 9,25; 15 i 25 MBq) pokazuje da su ^{177}Lu -DMSA-SMNČ pretežno lokalizovane na mestu uboda (plavi tragovi na slici 50 A i B). Metoda bojenja isečaka tkiva sa PP pokazala se kao veoma jednostavna, senzitivna i brza za dokazivanje zadržavanja nanočestica na bazi Fe_3O_4 u tkivima kako različitih organa, tako i u tumorskom tkivu (251).



Slika 50. Reprezentativne mikrofotografije CT-26 tumora nakon i.t. primene ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (PP, 200x)

Pretpostavlja se da je ovakav nalaz u vezi sa građom samog tumora (gusto zbijene ćelije i slaba vaskularizacija). Ipak, β^- zračenje koje potiče od ^{177}Lu dovodi do značajne supresije rasta tumora (polja umerene do izražene nekroze). Kao što se može videti sa prikazanih mikrofotografija, stepen nekroze je dozno-zavisan. Najmanji stepen nekroze tumorskog tkiva (diskretna nekroza) postiže se nakon primene 1,85 MBq ^{177}Lu , kao i nakon primene 3,7 MBq ^{177}Lu , dok se najveći stepen (izražena nekroza) postiže injektovanjem doza od 15 i 25 MBq ^{177}Lu . Smatra se da su osim direktnog (domet u tkivima je oko 2 mm) i indirektnog dejstva jonizujućeg zračenja putem slobodnih radikala, značajni i neciljani efekti zračenja („cross-fire”efekat, BE, CE i AE) (252–255)

Patohistološkom analizom 4T1 tumora nakon i.t. injektovanja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ dokazano je da u zavisnosti od građe ovog tumora (ćelije su slabo diferentovane i karakteriše ih prisustvo velikih hiperhromatskih jedara i relativno mala količina citoplazme, tumori su sa povećanom vaskularizacijom) (169,256), dolazi do nešto intenzivnijeg širenja radioobeleženih čestica po tkivu tumora sa mesta primene, u odnosu na CT-26 tumor (plave tačkice na slici 51 A i B).



Slika 51. Reprezentativne mikrofotografije 4T1 tumora nakon i.t. primene ^{177}Lu - DMSA-SMNC (PP, 200x)

Međutim, kako je u pitanju tumor visokog nivoa biološke invazivnosti i sa velikim metastatskim potencijalom, manje doze (do 9,25 MBq) samo suprimiraju rast, dok su veće doze (od 15 i 25 MBq) dovele do potpune regresije rasta, što je praćeno izraženom nekrozom tumorskog tkiva. Niže doze dovele su samo do diskretne (1,85 i 3,7 MBq), odnosno umerene nekroze (9,25 MBq). Čelije koje nisu primile dozu zračenja ili je ona izuzetno mala, nastavile su agresivno da rastu.

Dobijeni rezultati pokazuju da intratumorska primena nanomaterijala obeleženog radionuklidom ima veliki potencijal u terapiji solidnih tumora zbog svoje visoke efikasnosti i smanjenja neželjenih efekata. Ova metoda se karakteriše minimalno invazivnim tretmanom (injekcija) i manjim rizikom, a obezbedila bi se najveća korist za pacijenta.

Međutim, svojstva tumora kao što su tip tumora, struktura strome, brzina deobe tumorskih ćelija, a time i brzina rasta tumora, odnosno sama veličina tumora, vaskularizacija, metastatski potencijal i drugo, predstavljaju važne parametre koje treba uzeti u obzir pri izboru radionuklida, tj. energije i vrste zračenja, kao i radioaktivnosti (doze) koju treba primeniti da bi se ostvario željeni terapijski efekat. Takođe je veoma važno započeti lečenje u ranoj fazi razvoja tumora kada je veličina tumora manja i pre bilo kakvog lokalnog ili udaljenog metastatskog širenja. U skladu sa rezultatima, iako se i.t. injektiranjem radioobeleženih nanočestica nije postigla njihova uniformna intratumorska distribucija, ostvaren je značajan terapijski efekat. Intratumorska primena radioobeleženih nanočestica kod ljudi bi se morala izvoditi uz primenu radioloških tehnika vizuelizacije (radioskopija, ultrazvuk, kompjuterizovana tomografija).

Pristup koji uključuje primenu lokalne intratumorske injekcije, pažljiv odabir radionuklida, optimizaciju radioaktivne doze i precizno određivanje količine nanočestica može poslužiti kao temelj za uspostavljanje ciljanog lečenja zasnovanog na principima personalizovane medicine. Ovaj koncept omogućava prilagođavanje terapije svakom pacijentu ponaosob, uzimajući u obzir genetske, biološke, fiziološke i fenotipske karakteristike njegovog tumora. Na ovaj način lekarima je omogućeno da prilagode terapiju invazivnih malignih tumora bez metastaza, ali i preduprede nastanak metastaza u fazi dok je maligna bolest lokalizovana.

5. ZAKLJUČAK

- ✓ Sinteza SMNČ na bazi magnetita izvedena je metodom koprecipitacije, kao i njenim modifikacijama: metodom koprecipitacije praćenom kiselinskim postupkom i metodom koprecipitacije uz primenu mikrotalasa. Korišćenje različitih modifikacija osnovnog metoda sinteze koprecipitacijom nije dovelo do značajnih razlika u prosečnoj veličini sintetisanih čestica. Klasičnom metodom dobijene su čestice sfernog oblika, ujednačene veličine (prečnika ~ 11 nm, Pdl $\sim 28\%$), pogodne za dalju površinsku modifikaciju, koje su korišćene u daljim istraživanjima.
- ✓ Oblaganjem površine SMNČ sa MDP, HEDP i DMSA, dobijene su biokompatibilne i stabilne nanosuspencije, sa velikim brojem funkcionalnih grupa (-OH, -SH₂ i -COOH) na površini. FTIR spektroskopijom i određivanjem vrednosti zeta potencijala potvrđeno je prisustvo molekula MDP/HEDP/DMSA na površini SMNČ-a, što predstavlja dokaz uspešnog oblaganja sintetisanih SMNČ.
- ✓ Primenom spoljašnjeg promenljivog magnetnog polja jačine 23,9 kA/m i tri različite frekvencije (252, 397 i 577 kHz) određena je sposobnost generisanja toplote (SAR vrednost) obloženih SMNČ. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da HEDP-SMNČ imaju veću SAR vrednost (141,4 W/g) u odnosu na MDP-SMNČ (113,3 W/g) i DMSA-SMNČ (102,6 W/g) pri datoj jačini magnetnog polja i frekvenciji od 577 kHz.
- ✓ Optimizovani su reakcioni uslovi obeležavanja SMNČ sa ^{99m}Tc (količinski odnos čestica i kalaj (II)-jona, pH vrednost nanosuspencije, temperatura i reakciono vreme). Dobijene su radioobeležene SMNČ (^{99m}Tc-MDP-SMNČ, ^{99m}Tc-HEDP-SMNČ i ^{99m}Tc-DMSA-SMNČ) visoke radiohemijske čistoće u visokom prinosu (>95%). Najveći prinos obeležavanja dobijen je kod ^{99m}Tc-DMSA-SMNČ, nakon 30 minuta, na sobnoj temperaturi i pH 4 ($98,0 \pm 1,0\%$).
- ✓ Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja SAR vrednosti za sve tri obložene SMNČ (MDP-SMNČ, HEDP-SMNČ, DMSA-SMNČ), kao i na osnovu rezultata obeležavanja obloženih SMNČ tehnecijumom-99m, zaključuje se da se ^{99m}Tc-HEDP-SMNČ može smatrati potencijalnim teranostičkim agensom i da može biti predmet daljih pretkliničkih ispitivanja.
- ✓ Optimizacijom uslova obeležavanja SMNČ lutecijumom-177 (pH vrednost nanosuspencije, temperatura i reakciono vreme), najveći prinos radioobeležavanja dobijen je sa ¹⁷⁷Lu-DMSA-SMNČ, ($86,6 \pm 2,1 \%$) u odnosu na ¹⁷⁷Lu-MDP-SMNČ ($74,2 \pm 0,3$) i ¹⁷⁷Lu-HEDP-SMNČ ($72,5 \pm 1,2\%$). U skladu sa tim, sva dalja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja su izvedena sa ¹⁷⁷Lu-DMSA-SMNČ.
- ✓ *In vitro* stabilnost dobijenih radioobeleženih SMNČ ispitana je u humanom serumu i fiziološkom rastvoru na 37 °C, tokom 24 h od obeležavanja tehnecijumom-99m i tokom 6 dana (144 h) od obeležavanja lutecijumom-177. Dobijena je radiohemijska čistoća veća od 85% kod ^{99m}Tc obeleženih SMNČ, dok je kod ¹⁷⁷Lu obeleženih SMNČ bila veća od 95%, što ukazuje da su dobijene radioobeležene čestice stabilne u uslovima ispitivanja i pogodne za dalja, *in vivo* istraživanja.
- ✓ Rezultati ispitivanja biodistribucije ^{99m}Tc-obeleženih obloženih SMNČ (aktivnosti $\sim 2,5$ MBq; 0,1 ml/0,2 mg SMNČ) na zdravim pacovima soja Wistar pokazuju da, nakon intravenskog injektovanja, radioaktivno obeležene nanočestice karakteriše brzi klirens iz sistemske cirkulacije i značajan porast radioaktivnosti u jetri i

slezini. Maksimalno nakupljanje je 1 sat nakon injektovanja u jetri ($83,30 \pm 2,5$ i $77,10 \pm 5,3$ % ID/organu) i slezini ($14,1 \pm 1,0$ i $18,0 \pm 1,26$ % ID/organu) za ^{99m}Tc -MDP-SMNČ, odnosno ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ, redom. Kod ^{99m}Tc -DMSA-SMNČ, maksimalno nakupljanje u jetri bilo je nakon 2 sata od intravenskog injektovanja $84,6 \pm 4,20$ % ID/organu, a u slezini $4,97 \pm 0,31$ % ID/organu. U ostalim organima uočeno je zanemarljivo prisustvo radioaktivnosti.

- ✓ Scintigrafska snimanja izvedena su na Wistar belim pacovima sa ^{99m}Tc -HEDP-SMNČ. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno dobijenim rezultatima biodistribucije.
- ✓ Ispitivanje biološke raspodele nakon i.v. injektovanja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (0,5 MBq/0,1 mg /0,05 ml) na BALB/c miševima sa indukovanim ksenograftima CT-26 i 4T1 tumora je pokazalo da obeležene čestice odlikuje brzi klirens iz krvi i nakupljanje u jetri (>85 % ID/organu nakon 60 minuta) i slezini (> 8 % ID/organu nakon 60 minuta), dok je nakupljanje u tumoru bilo < 1 % ID/organu. Ovo se može objasniti fizičko-hemijskim svojstvima DMSA-SMNČ, usled kojih one nakon ulaska u cirkulaciju brzo bivaju prepoznate i opsonizovane od strane proteina plazme, a zatim i fagocitovane od strane retikuloendotelnog sistema (RES).
- ✓ Nakupljanje u kostima (< 3 % ID/organu) pokazuje da ne dolazi do značajnije razgradnje kompleksa *in vivo* i oslobađanja slobodnog $^{177}\text{Lu}^{3+}$, što ukazuje da su ^{177}Lu -DMSA-SMNČ stabilne *in vivo*.
- ✓ Ispitivanje biološke raspodele nakon i.t. injektiranja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (0,5 MBq /0,1 mg / 0,05 mL) izvršeno je snimanjem BALB/c miševa Bruker Xtreme II uređajem (1, 5. i 11. dana od dana injektovanja), kao i merenjem radioaktivnosti po organima u gama brojaču (1. i 14. dana). ^{177}Lu -DMSA-SMNČ kod miševa sa indukovanim ksenograftima CT-26 tumora ostaje u tumorskom tkivu dovoljno dugo da zračenje može da izazove terapijski efekat (>95 % nakon 14. dana od injektovanja). Nešto lošiji rezultati dobijeni su kod miševa sa indukovanim ksenograftima 4T1 tumora (od 1. do 14. dana radioaktivnost u tumorima se smanjila sa 92% na 72% ID/organu, dok je radioaktivnost u jetri rasla tokom vremena sa 3,2%ID do 19,8 %ID/organu nakon 14. dana). Smatra se da je razlog priroda i građa samog tumora. Odsustvo radioaktivnosti u kostima potvrđuje da nije došlo do oslobađanja $^{177}\text{Lu}^{3+}$, tj. da su obeležene DMSA-SMNČ stabilne.
- ✓ Ispitivanje terapijskog efekta nakon jednokratnog i.t. injektovanja pet doza ^{177}Lu -DMSA-SMNČ (1,85; 3,7; 9,25; 15 i 25 MBq) tokom 14 dana pokazalo je da je nanobrahiterapija (NBT) u dozama od 1,85; 3,7 i 9,25 MBq statistički značajno ($p<0,05$) suprimirala rast, dok su doze od 15 MBq i 25 MBq dovele do gotovo potpunog uništenja tumorske mase kod oba tipa indukovanih ksenografta.
- ✓ Statistički značajno manje mase tumora izmerene su kod svih tretiranih grupa u odnosu na kontrolnu grupu. Ispitivanje uticaja različitih početnih veličina tumora ($45\text{--}75\text{ mm}^3$, $100\text{--}150\text{ mm}^3$ i $200\text{--}300\text{ mm}^3$) na terapijsku efikasnost 3,7 MBq ^{177}Lu -DMSA-SMNČ nakon i.t. injekcije pokazalo je da antitumorski efekat zavisi od početne veličine tumora u trenutku primene zračenja i da je za postizanje boljeg terapijskog efekta neophodno započeti terapiju u što ranijoj fazi bolesti i sa manjim dozama zračenja.

- ✓ ^{177}Lu je zahvaljujući svojim povoljnim fizičko-hemijskim karakteristikama jedan od radionuklida izbora za obeležavanje nanočestica za primenu u nanobrahiterapiji (NBT). Primena ^{177}Lu omogućava nizak nivo izloženosti zračenju zdravih organa i tkiva, usled kratkog maksimalnog dometa u tkivu (od samo 2 mm). Ne očekuje se opšta ili tkivno specifična toksičnost. ^{177}Lu je zbog niske energije zračenja pogodan radionuklid za terapiju tumora manje zapremine (do 150 mm³), dok je za tumore većih zapremina preporuka da se primene radionuklidi većih energija zračenja (^{186}Re ili ^{90}Y).
- ✓ Promene telesne mase BALB/c miševa manje od 20% pokazuju da i.t način injektovanja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ značajno smanjuje toksičnost koje emitovano zračenje izaziva u zdravim organima ili tkivima nakon i.v. primene, što je dodatno potvrđeno mikroskopskim pregledom organa od interesa (srce, pluća, jetra, slezina, bubrezi). Mikroskopskim pregledom nisu uočene značajne patološke promene nakon i.t. injektovanja ^{177}Lu -DMSA-SMNČ.
- ✓ Patohistološka ispitivanja tumora pokazala su da su oštećenje tumorskog tkiva i stepen nekroze tumora dozno zavisni. Najmanji stepen nekroze tumorskog tkiva (diskretna nekroza) postignut je nakon primene doze od 1,85 MBq ^{177}Lu -DMSA-SMNČ, kao i nakon primene 3,7 MBq ^{177}Lu -DMSA-SMNČ, dok je najveći stepen, u vidu izražene nekroze, postignut primenom doza od 15 i 25 MBq ^{177}Lu -DMSA-SMNČ.
- ✓ Svi navedeni rezultati istraživanja ukazuju da intratumorska primena ^{177}Lu -DMSA-SMNČ ima znatan potencijal u terapiji solidnih tumora, zahvaljujući postignutoj visokoj efikasnosti i smanjenju neželjenih dejstava. Ova metoda odlikuje se minimalno invazivnim tretmanom putem injekcije i nižim rizikom, i pruža najveću korist za pacijenta. Pristup koji uključuje lokalnu intratumorsku injekciju, izbor radionuklida, dozu radioaktivnosti i količinu nanočestica omogućava uspostavljanje ciljanog lečenja prema principima personalizovane medicine. U perspektivi, onkološki konzilijumi će uzimajući u obzir genetske, biološke, fiziološke i fenotipske karakteristike moći da prilagode lečenje i prevenciju svakom pacijentu ponaosob.

6. LITERATURA

1. Chhikara BS, Parang K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chem Biol Lett.* 2023;10(1).
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
3. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(1):12–49.
4. Baskar R, Dai J, Wenlong N, Yeo R, Yeoh KW. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front Mol Biosci.* 2014;1(NOV):1–9.
5. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Maligni tumori u Republici Srbiji 2021. 2023.
6. Sivakumar P, Malliappan, Palanivel Kandasamy, Siva Chidambaram, Devanand Venkatasubbu SKP and AS. Breast Cancer Targeted Treatment Strategies: Promising Nanocarrier Approaches. *Anticancer Agents Med Chem.* 2020;20(11):1300–10.
7. Cui G, Wu J, Lin J, Liu W, Chen P, Yu M, et al. Graphene-based nanomaterials for breast cancer treatment: promising therapeutic strategies. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2021;19(1):1–30.
8. Oruc Z, Kaplan MA. Effect of exercise on colorectal cancer prevention and treatment. *World J Gastrointest Oncol.* 2019;11(5):348–66.
9. Labianca R, Beretta GD, Mosconi S, Milesi L, Pessi MA. Colorectal cancer: Screening. *Ann Oncol* [Internet]. 2005;16(SUPPL. 2):127–32.
10. Davidovic V, Miladinov B, Davidovic B. Primary colorectal cancer in our clinical practice for a period of five years. *Timoc Med Glas.* 2017;42(3):139–46.
11. Liu Z. Gastrointestinal cancers. *Radiomics and Radiogenomics: Technical Basis and Clinical Applications.* 2019: 283–299.
12. Ministarstvo Zdravlja, Republike Srbije. Nacionalni vodi dobre kliničke prakse, Rak kolona i rektuma. 2013;
13. Yang F, He Q, Dai X, Zhang X, Song D. The potential role of nanomedicine in the treatment of breast cancer to overcome the obstacles of current therapies. *Front Pharmacol.* 2023;14:1–12.
14. Wang J, Wu SG. Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. *Breast Cancer Targets Ther.* 2023;15:721–30.
15. ATSDR. Toxicological Profile for Ionizing Radiation. Atlanta (GA). Agency Toxic Subst Dis Regist (US) [Internet]. 1999.
16. Manual RC. Biological Effects of Radiation. *Phys Today.* 1956;9(7):34–5.
17. Rita G, Surajit H. Targeted and non-targeted effects of radiation in mammalian cells: An overview. *Arch Biotechnol Biomed.* 2021;5(1):013–9.
18. Gong L, Zhang Y, Liu C, Zhang M, Han S. Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:1083–102.

19. Jovanović DM. Jonizujuća zračenja i životna sredina. 1983.
20. Relić M, Relić G. Radiobiološki efekti na kožu, Basis of radiobiological effect on men - radiobiological effect on skin. 2007;35:107–12.
21. Saha GB. Physics and radiobiology of nuclear medicine. *Phys Radiobiol Nucl Med*. 2013;1–356.
22. Ravichandran A, Clegg J, Adams MN, Hampson M, Fielding A, Bray LJ. 3D Breast Tumor Models for Radiobiology Applications. *Cancers*. 2021;13(22):1–20.
23. Kasparek TR, Humphrey TC. DNA double-strand break repair pathways, chromosomal rearrangements and cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(8):886–97.
24. Sage E, Harrison L. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: Relevance to mutagenesis and cell survival. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* [Internet]. 2011;711(1–2):123–33.
25. Branislava Mitrović. Radiobiologija sa radijacionom higijenom. 2021.
26. Radoslav Borota i Ljubomir Stefanović (urednici), Nuklearna medicina, Univerzitet u Novom Sadu - Medicinski fakultet, Novi Sad, 1992.
27. Desouky O, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J Radiat Res Appl Sci* [Internet]. 2015;8(2):247–54.
28. Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdui CM. Effects of ionizing radiation on biological molecules - mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants Redox Signal*. 2014;21(2):260–92.
29. Widel M. Radiation Induced Bystander Effect: From <i>in Vitro</i> Studies to Clinical Application. *Int J Med Physics, Clin Eng Radiat Oncol*. 2016;05(01):1–17.
30. Daguenet E, Louati S, Wozny AS, Vial N, Gras M, Guy JB, et al. Radiation-induced bystander and abscopal effects: important lessons from preclinical models. *Br J Cancer*. 2020;123(3):339–48.
31. Mukherjee S, Chakraborty A. Radiation-induced bystander phenomenon: insight and implications in radiotherapy. *Int J Radiat Biol*. 2018;95(3):243–63.
32. Nagasawa H, Little JB. Induction of Sister Chromatid Exchanges by Extremely Low Doses of α -Particles. *Cancer Res*. 1992;52(22):6394–6.
33. M N, R, Fardid* HG, M F. The Mechanisms of Radiation-Induced Bystander Effect. *J Biomed Phys Eng*. 2014;4(4):163–72.
34. Belyakov O V, Mitchell SA, Parikh D, Randers-Pehrson G, Marino SA, Amundson SA, et al. Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(40):14203–8.
35. Blyth BJ, Sykes PJ. Radiation-induced bystander effects: What are they, and how relevant are they to human radiation exposures? *Radiat Res*. 2011;176(2):139–57.
36. Yilmaz MT, Elmali A, Yazici G. Abscopal Effect, From Myth to Reality: From Radiation Oncologists' Perspective. *Cureus*. 2019;11(1):9–13.

37. Zhang D, Zhou T, He F, Rong Y, Lee SH, Wu S, et al. Reactive oxygen species formation and bystander effects in gradient irradiation on human breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(27):41622–36.
38. Baskar R. Emerging role of radiation induced bystander effects: Cell communications and carcinogenesis. *Genome Integr*. 2010;1:1–8.
39. Wang R, Zhou T, Liu W, Zuo L. Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/ cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget*. 2018;9(26):18637–47.
40. Haberkorn U, Giesel F, Morgenstern A, Kratochwil C. The future of radioligand therapy: α , β , or Both? *J Nucl Med*. 2017;58(7):1017–8.
41. Bostrom PJ, Soloway MS. Secondary Cancer After Radiotherapy for Prostate Cancer: Should We Be More Aware of the Risk? *Eur Urol*. 2007;52(4):973–82.
42. Alsharef S, Alanazi M, Alharthi F, Qandil D, Qushawy M. Review about radiopharmaceuticals: Preparation, radioactivity, and applications. *Int J Appl Pharm*. 2020;12(3):8–15.
43. Ghobril C, Lamanna G, Kueny-Stotz M, Garofalo A, Billotey C, Felder-Flesch D. Dendrimers in nuclear medical imaging. *New J Chem*. 2012;36(2):310–23.
44. Han R. Radioisotopes for Diagnostics – Recent developments, *Medicinski glasnik Instituta za štitastu žlezdu i metabolizam “Zlatibor”*, 2006, vol. 11 (20), 31-37.
45. Vučina J, Nikolić N, Petrović D. Technetium-99m in production and use. *Nucl Technol Radiat Prot*. 2009;24(1):68–73.
46. Pijeira MSO, Viltres H, Kozempel J, Sakmár M, Vlk M, İlem-Özdemir D, et al. Radiolabeled nanomaterials for biomedical applications: radiopharmacy in the era of nanotechnology. *EJNMMI Radiopharm Chem*. 2022;7(1).
47. Preg M, Sad N, Pregledni B, Use T, Vucina J, Han R, et al. Primena radionuklida u terapiji. 245–50.
48. Herrmann K, Schwaiger M, Lewis JS, Solomon SB, McNeil BJ, Baumann M, et al. Radiotheranostics: a roadmap for future development. *Lancet Oncol*. 2020;21(3):146–56.
49. Sgouros G, Bodei L, McDevitt MR, Nedrow JR. Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(9):589–608.
50. McDevitt MR, Sgouros G, Sofou S. Targeted and Nontargeted α -Particle Therapies. *Annu Rev Biomed Eng*. 2018;20:73–93.
51. Qaim SM. Therapeutic radionuclides and nuclear data. *Radiochim Acta*. 2001;89(4–5):297–302.
52. Lewington VJ. *European Journal of Nuclear Medicine Targeted radionuclide therapy for bone metastases*. 1993.
53. Dash A, Knapp FF, Pillai M. Targeted Radionuclide Therapy - An Overview. *Curr Radiopharm*. 2014;6(3):152–80.

54. Ferrier MG, Radchenko V. An Appendix of Radionuclides Used in Targeted Alpha Therapy. *J Med Imaging Radiat Sci*. 2019;50(4):S58–65.
55. Banerjee S, Pillai MRA, Knapp FF. Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: Linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chem Rev*. 2015;115(8):2934–74.
56. Filippi L, Palumbo B, Bagni O, Frantellizzi V, De Vincentis G, Schillaci O. DNA Damage Repair Defects and Targeted Radionuclide Therapies for Prostate Cancer: Does Mutation Really Matter? A Systematic Review. *Life*. 2023;13(1).
57. Salih S, Alkatheeri A, Alomaim W, Elliyanti A. Radiopharmaceutical Treatments for Cancer Therapy, Radionuclides Characteristics, Applications, and Challenges. *Molecules*. 2022;27(16):1–16.
58. Rezaur Rahman AKM, Amin R. Production route analysis of a therapeutic radionuclide 177Lu. *AIP Adv* 2022;12(9).
59. Salvanou EA, Bouziotis P, Tsoukalas C. Radiolabeled Nanoparticles in Nuclear Oncology. *Adv Nano Res*. 2018;1(1):38–55.
60. Xue Y, Gao Y, Meng F, Luo L. Recent progress of nanotechnology-based theranostic systems in cancer treatments. *Cancer Biol Med*. 2021;18(2):336–51.
61. Duan H, Iagaru A, Aparici CM. Radiotheranostics – Precision Medicine in Nuclear Medicine and Molecular Imaging. *Nanotheranostics*. 2022;6(1):103–17.
62. Marin JFG, Nunes RF, Coutinho AM, Zaniboni EC, Costa LB, Barbosa FG, et al. Theranostics in nuclear medicine: Emerging and re-emerging integrated imaging and therapies in the era of precision oncology. *Radiographics*. 2020;40(6):1715–40.
63. Barca C, Griessinger CM, Faust A, Depke D, Essler M, Windhorst AD, et al. Expanding theranostic radiopharmaceuticals for tumor diagnosis and therapy. *Pharmaceuticals*. 2022;15(1):1–20.
64. LeBlanc RA, Oza UD, Hayden R, Fanous H. Use of 68Ga DOTATATE, a new molecular imaging agent, for neuroendocrine tumors. *Baylor Univ Med Cent Proc [Internet]*. 2020;33(1):51–2.
65. Palot Manzil FF, Kaur H, Szabados L. Gallium-68 Prostate-Specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography: A Practical Guide for Radiologists and Clinicians. *Cureus*. 2022;14(3).
66. Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, Li SD. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J Control Release*. 2013;172(3):782–94.
67. 2022/C229/01<https://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32022H0614%2801%29>, datum pristupa 12.2024.
68. Souto EB, Silva GF, Dias-ferreira J, Zielinska A, Ventura F, Durazzo A, et al. Nanopharmaceuticals: Part i—clinical trials legislation and good manufacturing practices (GMP) of nanotherapeutics in the EU. *Pharmaceuticals*. 2020;12(2):1–13.

69. Fan J, Liu B, Long Y, Wang Z, Tong C, Wang W, et al. Sequentially-targeted biomimetic nano drug system for triple-negative breast cancer ablation and lung metastasis inhibition. *Acta Biomater.* 2020;113:554–69.
70. Chen S, Hao X, Liang X, Zhang Q, Zhang C, Zhou G, et al. Inorganic nanomaterials as carriers for drug delivery. *J Biomed Nanotechnol.* 2016;12(1):1–27.
71. Ramasamy S, Dhamecha D, Kaliyamoorthi K, Pillai AS, Alexander A, Dhanaraj P, et al. Magnetic hydroxyapatite nanomaterial-cyclodextrin tethered polymer hybrids as anticancer drug carriers. *Mater Adv.* 2021;2(10):3315–27.
72. Webster DM, Sundaram P, Byrne ME. Injectable nanomaterials for drug delivery: Carriers, targeting moieties, and therapeutics. *Eur J Pharm Biopharm [Internet].* 2013;84(1):1–20.
73. Krasteva N, Georgieva M. Promising Therapeutic Strategies for Colorectal Cancer Treatment Based on Nanomaterials. *Pharmaceutics.* 2022;14(6):1–38.
74. Samsudin CM. Silver nanoparticles for delivery purposes. *I Ghiuta, D Cris [Internet].* 2020;68(1):1–12.
75. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 2006;6(4):662–8.
76. Guo T, Lin M, Huang J, Zhou C, Tian W, Yu H, et al. The recent advances of magnetic nanoparticles in medicine. *J Nanomater.* 2018;2018.
77. Gogoi P, Kaur G, Singh NK. Nanotechnology for colorectal cancer detection and treatment. *World J Gastroenterol.* 2022;28(46):6497–511.
78. Mushtaq S, Bibi A, Park JE, Jeon J. Recent progress in technetium-99m-labeled nanoparticles for molecular imaging and cancer therapy. *Nanomaterials.* 2021;11(11).
79. Abolfazl Akbarzadeh1. Magnetic nanoparticles: preparation. *J Minim Invasive Gynecol.* 2012;(7):144.
80. Krishnan KM. Biomedical nanomagnetics: A spin through possibilities in imaging, diagnostics, and therapy. *IEEE Trans Magn.* 2010;46(7):2523–58.
81. Jary JN, Machnicka B. Pharmacokinetics of magnetic iron oxide nanoparticles for medical applications. *J Nanobiotechnology.* 2022;1–30.
82. Vasić K, Knez Ž, Leitgeb M. Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles as Promising Magnetic Biomaterials in Drug Delivery: A Review. *J Funct Biomater.* 2024;15(8).
83. Jordan A, Scholz R, Wust P, Fähling H, Felix R. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater.* 1999;201(1–3):413–9.
84. Gilchrist RK, Shorey WD, Hanselman RC, Parrott JC, Taylor CB. *Gilchrist.Pdf.* Vol. 146, *Ann. Surg.* 1957. 596–606.
85. Weissig V, Pettinger TK, Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:4357–73.

86. Lu AH, Salabas EL, Schüth F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chemie - Int Ed*. 2007;46(8):1222–44.
87. Gupta AK, Naregalkar RR, Vaidya VD, Gupta M. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine*. 2007;2(1):23–39.
88. Casula MF, Jun YW, Zaziski DJ, Chan EM, Corrias A, Alivisatos AP. The concept of delayed nucleation in nanocrystal growth demonstrated for the case of iron oxide nanodiscs. *J Am Chem Soc*. 2006;128(5):1675–82.
89. Kuznetsova Y V, Balyakin IA, Popov ID, Schummer B, Sochor B, Rempel S V, et al. Ag₂S interparticle interaction in an aqueous solution: Mechanism of steric and electrostatic stabilization. *J Mol Liq [Internet]*. 2021;335:116130.
90. Chopra D. Radiolabelled Nanoparticles for Diagnosis and Treatment of Cancer. *Radioisot - Appl Bio-Medical Sci*. 2011.
91. Snehalatha M, Venugopal K, Saha RN. Etoposide-Loaded PLGA and PCL Nanoparticles I: Preparation and Effect of Formulation Variables. *Drug Deliv*. 2008;15(5):267–75.
92. Hong H, Zhang Y, Sun J, Cai W. Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. *Nano Today*. 2009;4(5):399–413.
93. Zolle Ilse (editor). Technetium-99m pharmaceuticals: Preparation and quality control in nuclear medicine. *Technetium-99m Pharmaceuticals: Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*. 2007. (Part I), 1–345.
94. Enrique MA, Mariana OR, Mirshojaei SF, Ahmadi A. Multifunctional radiolabeled nanoparticles: Strategies and novel classification of radiopharmaceuticals for cancer treatment. *J Drug Target [Internet]*. 2015;23(3):191–201.
95. Zolle I. *Technetium-99m Pharmaceuticals Preparation and Quality*. Springer (Part II) 2007;173–337.
96. Nikzad M, Jalilian AR, Shirvani-Arani S, Bahrami-Samani A, Golchoubian H. Production, quality control and pharmacokinetic studies of ¹⁷⁷Lu-zoledronate for bone pain palliation therapy. *J Radioanal Nucl Chem*. 2013;298(2):1273–81.
97. Roohi F, Lohrke J, Ide A, Schütz G, Dassler K. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:4447–58.
98. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials*. 2006;27(24):4356–73.
99. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*. 2006;307(1):93–102.
100. Martinkova P, Brtnicky M, Kynicky J, Pohanka M. Iron Oxide Nanoparticles: Innovative Tool in Cancer Diagnosis and Therapy. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(5).
101. Mulens-Arias V, Rojas JM, Barber DF. The intrinsic biological identities of iron oxide nanoparticles and their coatings: Unexplored territory for combinatorial therapies. *Nanomaterials*. 2020;10(5):1–39.

102. Arami H, Khandhar A, Liggitt D, Krishnan KM. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2015;44(23):8576–607.
103. Karmali PP, Simberg D. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: Implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*. 2011;8(3):343–57.
104. Almeida JPM, Chen AL, Foster A, Drezek R. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine*. 2011;6(5):815–35.
105. Feng Q, Liu Y, Huang J, Chen K, Huang J, Xiao K. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Sci Rep [Internet]*. 2018;8(1):1–13.
106. Graczyk H, Bryan LC, Lewinski N, Suarez G, Coullerez G, Bowen P, et al. Physicochemical characterization of nebulized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs). *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2015;28(1):43–51.
107. Yang L, Kuang H, Zhang W, Aguilar ZP, Xiong Y, Lai W, et al. Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice. *Nanoscale*. 2015;7(2):625–36.
108. Gupta AK, Wells S. Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2004;3(1):66–73.
109. Jokerst J V, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine*. 2011;6(4):715–28.
110. Atle KB saebo, Derek B. Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats : implications for magnetic resonance imaging. 2004;315–23.
111. Saraswathy A, Nazeer SS, Jeevan M, Nimi N, Arumugam S, Harikrishnan VS, et al. Citrate coated iron oxide nanoparticles with enhanced relaxivity for in vivo magnetic resonance imaging of liver fibrosis. *Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]*. 2014;117:216–24.
112. Fujita T, Nishikawa M, Ohtsubo Y, Hashida M. Control of in vivo fate of albumin derivatives utilizing combined chemical modification. *J Drug Target*. 1994;2(2):157–65.
113. Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul*. 1996;13(3):245–55.
114. Nowak-Jary J, Machnicka B. In vivo Biodistribution and Clearance of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications. *Int J Nanomedicine*. 2023;18(July):4067–100.
115. Arami H, Khandhar A, Liggitt D, Krishnan KM. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev [Internet]*. 2015;44(23):8576–607.

116. Qian X, Xu X, Wu Y, Wang J, Li J, Chen S, et al. Strategies of engineering nanomedicines for tumor retention. *J Control Release*. 2022;346(April):193–211.
117. Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J Control Release* [Internet]. 2012;161(2):175–87.
118. Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2010;7(11):653–64.
119. Ngoune R, Peters A, von Elverfeldt D, Winkler K, Pütz G. Accumulating nanoparticles by EPR: A route of no return. *J Control Release* [Internet]. 2016;238:58–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.028>
120. Giustini AJ, Petryk AA, Cassim SM, Tate JA, Baker I, Hoopes PJ. Nano Life. *Nano Life*. 2010;1:17–32.
121. Yun WS, Kim J, Lim DK, Kim DH, Jeon SI, Kim K. Recent Studies and Progress in the Intratumoral Administration of Nano-Sized Drug Delivery Systems. *Nanomaterials*. 2023;13(15).
122. Yoo J, Park C, Yi G, Lee D, Koo H. Active targeting strategies using biological ligands for nanoparticle drug delivery systems. *Cancers*. 2019;11(5).
123. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(15):1615–26.
124. Prabhakar U, Maeda H, K. Jain R, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, et al. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res*. 2013;73(8):2412–7.
125. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(8):583–92.
126. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J Control Release* [Internet]. 2016;244:108–21.
127. Stefan Wilhelm, Anthony J. Tavares, Qin Dai, Seiichi Ohta, Julie Audet HFD and WCWC, Abstract. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Pract Midwife*. 2013;16(3):13–7.
128. Chu XY, Huang W, Wang YL, Meng LW, Chen LQ, Jin MJ, et al. Improving antitumor outcomes for palliative intratumoral injection therapy through lecithin–chitosan nanoparticles loading paclitaxel– cholesterol complex. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:689–705.
129. Moon JH, Moxley JW, Zhang P, Cui H. Nanoparticle approaches to combating drug resistance. *Future Med Chem*. 2015;7(12):1503–10.
130. Brachi G, Ruiz-Ramírez J, Dogra P, Wang Z, Cristini V, Ciardelli G, et al. Intratumoral injection of hydrogel-embedded nanoparticles enhances retention in glioblastoma. *Nanoscale*. 2020;12(46):23838–50.

131. Wilson RJ, Hui Y, Whittaker AK, Zhao CX. Facile bioinspired synthesis of iron oxide encapsulating silica nanocapsules. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2021;601:78–84.
132. Rodríguez F, Caruana P, De la Fuente N, Español P, Gámez M, Balart J, et al. Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges. *Biomolecules*. 2022;12(6):1–27.
133. Bonvalot S, Le Pechoux C, De Baere T, Kantor G, Buy X, Stoeckle E, et al. First Human Study Testing a New Radio Enhancer Using Nanoparticles (NBTXR3) Activated by Radiation Therapy in Patients with Locally Advanced Soft Tissue Sarcomas Running title (at the top of each page) (approx. 60 characters) Radiotherapy Plus Nanoparticl. *J Clin Oncol*. 2014;32.
134. Goins B, Phillips WT, Bao A, Code M, Antonio S, Reserve CW. Liposomal Drugs in Cancer Therapy. Vol. 13, *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016. 873–889.
135. Seniwal B, Thipe VC, Singh S, Fonseca TCF, Freitas de Freitas L. Recent Advances in Brachytherapy Using Radioactive Nanoparticles: An Alternative to Seed-Based Brachytherapy. *Front Oncol*. 2021;11.
136. Chargari C, Deutsch E, Blanchard P, Gouy S, Martelli H, Guérin F, et al. Brachytherapy: An overview for clinicians. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(5):386–401.
137. Tanderup K, Ménard C, Polgar C, Lindegaard JC, Kirisits C, Pötter R. Advancements in brachytherapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;109:15–25.
138. Ghosh S, Lee SJ, Hsu JC, Chakraborty S, Chakravarty R, Cai W. Cancer Brachytherapy at the Nanoscale: An Emerging Paradigm. *Chem Biomed Imaging*. 2024;2(1):4–26.
139. Seniwal B, Thipe VC, Singh S, Fonseca TCF, Freitas de Freitas L. Recent Advances in Brachytherapy Using Radioactive Nanoparticles: An Alternative to Seed-Based Brachytherapy. *Front Oncol*. 2021;11:1–24.
140. Danquah MK, Zhang XA, Mahato RI. Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2011;63(8):623–39.
141. Fukumura D, Jain RK. Tumor microenvironment abnormalities: Causes, consequences, and strategies to normalize. *J Cell Biochem*. 2007;101(4):937–49.
142. Jiang B, Zhou L, Lu J, Wang Y, Liu C, You L, et al. Stroma-Targeting Therapy in Pancreatic Cancer: One Coin With Two Sides? *Front Oncol*. 2020;10(October):1–9.
143. Leef G, Thomas SM. Molecular communication between tumor-associated fibroblasts and head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2013;49(5):381–6.
144. Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *J Cell Biochem*. 2019;120(3):2782–90.
145. Fearon DT. The carcinoma-associated fibroblast expressing fibroblast activation protein and escape from immune surveillance. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(3):187–93.

146. Sen A, Capitano ML, Spornyak JA, Schueckler JT, Thomas S, Singh AK, et al. Mild elevation of body temperature reduces tumor interstitial fluid pressure and hypoxia and enhances efficacy of radiotherapy in murine tumor models. *Cancer Res.* 2011;71(11):3872–80.
147. Pietras K, Sjöblom T, Rubin K, Heldin CH, Östman A. PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell.* 2003;3(5):439–43.
148. Rønnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: Importance of the stromal reaction. *Physiol Rev.* 1996;76(1):69–125.
149. Pluen A, Boucher Y, Ramanujan S, McKee TD, Gohongi T, Di Tomaso E, et al. Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: Cranial vs. subcutaneous tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(8):4628–33.
150. Hu J, Yuan X, Wang F, Gao H, Liu X, Zhang W. The progress and perspective of strategies to improve tumor penetration of nanomedicines. *Chinese Chem Lett [Internet].* 2021;32(4):1341–7.
151. Tanaka HY, Kano MR. Stromal barriers to nanomedicine penetration in the pancreatic tumor microenvironment. *Cancer Sci.* 2018;109(7):2085–92.
152. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;69(1):1–9.
153. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2015;33(9):941–51.
154. Wang SJ, Lin WY, Chen MN, Chi CS, Chen JT, Ho WL, et al. Intratumoral injection of rhenium-188 microspheres into an animal model of hepatoma. *J Nucl Med.* 1998;39(10):1752–7.
155. Dreher MR, Liu W, Michelich CR, Dewhirst MW, Yuan F, Chilkoti A. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(5):335–44.
156. Chauhan VP, Popović Z, Chen O, Cui J, Fukumura D, Bawendi MG, et al. Fluorescent nanorods and nanospheres for real-time in vivo probing of nanoparticle shape-dependent tumor penetration. *Angew Chemie - Int Ed.* 2011;50(48):11417–20.
157. Stylianopoulos T, Poh MZ, Insin N, Bawendi MG, Fukumura D, Munn LL, et al. Diffusion of particles in the extracellular matrix: The effect of repulsive electrostatic interactions. *Biophys J.* 2010;99(5):1342–9.
158. Jung Soo Suk, Qingguo Xua, Namho Kima, Justin Hanesa and LME. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99(Pt A):28–51.
159. Subbotin V, Fiksel G. Modeling multi-needle injection into solid tumor. *Am J Cancer Res.* 2019;9(10):2209–15.
160. Massart R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans Magn.* 1981;17(2):1247–8.

161. Radovic M, Mirkovic M, Peric M, Jankovic D, Vukadinovic A, Stankovic D, et al. Design and preparation of 90 Y-labeled imidodiphosphate-and inositol hexaphosphate-coated magnetic nanoparticles for possible medical applications. *This J is Cite this J Mater Chem B*. 2017;8738:8738.
162. Marinin A. Synthesis and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with silica. 2012;
163. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Trop J Pharm Res*. 2013;12(2):255–64.
164. Wildeboer RR, Southern P, Pankhurst QA. On the reliable measurement of specific absorption rates and intrinsic loss parameters in magnetic hyperthermia materials. *J Phys D Appl Phys*. 2014;47(49).
165. Radović M, Mirković M, Nikolić AS, Kuraica M, Iskrenović P, Milanović Z, et al. Transmittance Measurements in Non-alternating Magnetic Field as Reliable Method for Determining of Heating Properties of Phosphate and Phosphonate Coated Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles. *J Inorg Organomet Polym Mater [Internet]*. 2021;31(11):4426–33.
166. Stanković D, Radović M, Stanković A, Mirković M, Vukadinović A, Mijović M, et al. Synthesis, Characterization, and Therapeutic Efficacy of ¹⁷⁷Lu-DMSA@ SPIONs in Nanobrachytherapy of Solid Tumors. *Pharmaceutics*. 2023;15(7).
167. Psimadas D, Baldi G, Ravagli C, Bouziotis P, Xanthopoulos S, Franchini MC, et al. Preliminary evaluation of a ^{99m}Tc labeled hybrid nanoparticle bearing a cobalt ferrite core: In vivo biodistribution. *J Biomed Nanotechnol*. 2012;8(4):575–85.
168. Psimadas D, Baldi G, Ravagli C, Comes Franchini M, Locatelli E, Innocenti C, et al. Comparison of the magnetic, radiolabeling, hyperthermic and biodistribution properties of hybrid nanoparticles bearing CoFe₂O₄ and Fe₃O₄ metal cores. *Nanotechnology*. 2014;25(2).
169. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Curr Protoc Immunol*. 2000;39(1):1–16.
170. <https://www.creative-biogene.com/support/4T1-cell-line.html>.
171. Strobel Stevens J, Fine D, Webb M, Sarraf AM, Brattain MG. Establishment of Mouse Colonic Carcinoma Cell Lines with Different Metastatic Properties. *Cancer Res*. 1980;40(7):2142–6.
172. <https://www.atcc.org/products/crl-2638>.
173. Castle JC, Loewer M, Boegel S, de Graaf J, Bender C, Tadmor AD, et al. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. *BMC Genomics*. 2014;15(1).
174. Kothari K, Pillai MRA, Unni PR, Shimpi HH, Noronha OPD, Samuel AM. Preparation of [¹⁸⁶Re]Re-DMSA and its bio-distribution studies. *Appl Radiat Isot*. 1999;51(1):43–9.
175. Rana A, Lowe A, Lithgow M, Horback K, Janovitz T, Da Silva A, et al. Use of Deep Learning to Develop and Analyze Computational Hematoxylin and Eosin

- Staining of Prostate Core Biopsy Images for Tumor Diagnosis. *JAMA Netw Open*. 2020;3(5):1–15.
176. Iseki Y, Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Fukuoka T, Matsutani S, et al. A new method for evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer using hematoxylin and eosin (H-E)stained tumor sections. *PLoS One*. 2018;13(4):1–12.
177. Henwood AF. Hematoxylin and eosin staining of mucins of the gastrointestinal tract. *J Histotechnol* [Internet]. 2017;40(1):21–4.
178. Jasmin, Torres ALMH, Jelicks L, De Carvalho ACC, Spray DC, Mendez-Otero R. Labeling stem cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Analysis of the labeling efficacy by microscopy and magnetic resonance imaging. *Methods Mol Biol*. 2012;906(13):239–52.
179. Kang H. Sample size determination and power analysis using the G*Power software. *J Educ Eval Health Prof*. 2021;18:1–12.
180. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chem Rev*. 2008;108(6):2064–110.
181. Nawaz M, Sliman Y, Ercan I, Lima-Tenório MK, Tenório-Neto ET, Kaewsaneha C, et al. Magnetic and pH-responsive magnetic nanocarriers [Internet]. *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications: Volume 2: Advanced Nanocarriers for Therapeutics*. Elsevier Ltd.; 2018. 37–85.
182. Bader NR, Edbey K, Telgheder U. Cloud point extraction as a sample preparation technique for trace element analysis: An overview. *J Chem Pharm Res*. 2014;6(2):496–501.
183. Bal K, Şentürk S, Kaplan Ö, Gök MK, Kevser S. Optimization Studies of Mg / Al-NO₃ Layered Double Hydroxide Nanoparticles by Hydrothermal Treatment Mg / Al-NO₃ Çift Tabakalı Hidroksit Nanopartiküllerinin Hidrotermal İşlem İle Optimizasyonu Çalışmaları. 2023;5(3):163–75.
184. Ognjanović M, Stanković DM, Ming Y, Zhang H, Jančar B, Dojčinović B, et al. Bifunctional (Zn,Fe)₃O₄ nanoparticles: Tuning their efficiency for potential application in reagentless glucose biosensors and magnetic hyperthermia. *J Alloys Compd* [Internet]. 2019;777:454–62.
185. Gavilán H, Sánchez EH, Brollo MEF, Asín L, Moerner KK, Frandsen C, et al. Formation Mechanism of Maghemite Nanoflowers Synthesized by a Polyol-Mediated Process. *ACS Omega*. 2017;2(10):7172–84.
186. Ali A, Chiang YW, Santos RM. X-Ray Diffraction Techniques for Mineral Characterization: A Review for Engineers of the Fundamentals, Applications, and Research Directions. *Minerals*. 2022;12(2).
187. You A, Be M, In I. Synthesis and Characterization of Nanoparticle Magnetite. 2019;020137(August 2023):4–9.

188. Liu Y, Li Y, Li XM, He T. Kinetics of (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) silanization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Langmuir*. 2013;29(49):15275–82.
189. Lalatonne Y, Paris C, Serfaty JM, Weinmann P, Lecouvey M, Motte L. Bis-phosphonates-ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: A platform towards diagnosis and therapy. *Chem Commun*. 2008;(22):2553–5.
190. Peng ZG, Hidajat K, Uddin MS. Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles. *J Colloid Interface Sci*. 2004;271(2):277–83.
191. Khmara I, Koneracka M, Kubovcikova M, Zavisova V, Antal I, Csach K, et al. Preparation of poly-L-lysine functionalized magnetic nanoparticles and their influence on viability of cancer cells. *J Magn Magn Mater*. 2017;427(October):114–21.
192. F. Brodard-Severac, G. Geuerrero, J. Maquet, P. Florian, C. Gervais, P. H. Mutin, High-field ^{17}O MAS NMR investigation of phosphonic acid monolayers on titania, *Chem. Mater*. 20 (2008) 5191-5196.
193. P. J. Hotchkiss, The design, synthesis, and use of phosphonic acids for the surface modification of metal oxides, Doctoral thesis, Georgia Institute of Technology, 2008.
194. Ruiz A, Morais PC, Bentes de Azevedo R, Lacava ZGM, Villanueva A, del Puerto Morales M. Magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid: development, characterization, and application in biomedicine. *J Nanoparticle Res*. 2014;16(11).
195. Galli M, Guerrini A, Cauteruccio S, Thakare P, Dova D, Orsini F, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles functionalized by peptide nucleic acids. *RSC Adv*. 2017;7(25):15500–12.
196. Al. QAP et. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Appl Magn nanoparticles Biomed*. 2003;
197. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control release*. 2016;235:337–51.
198. Ognjanović M, Razvijanje površinski modifikovanih nanočestica na bazi magnetita obeleženih radionuklidima ^{90}Y i ^{177}Lu za potencijalnu primenu u magnetnoj hipertermiji i radionuklidnoj terapiji malignih tumora, doktorska disertacija, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, 2021;
199. Peacock RD. The Intensities of Lanthanide, *T r a n s i t i o n s*. *Struct Bond*. 1975;22:83–122.
200. Podstawka E, Borszowska R, Grabowska M, Drąg M, Kafarski P, Proniewicz LM. Investigation of molecular structures and adsorption mechanisms of phosphonodipeptides by surface-enhanced Raman, Raman, and infrared spectroscopies. *Surf Sci*. 2005;599(1–3):207–20.
201. Feng B, Hong RY, Wang LS, Guo L, Li HZ, Ding J, et al. Synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}/\text{PEG}$ diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2008;328(1–3):52–9.

202. Gonzalez-Fernandez MA, Torres TE, Andrés-Vergés M, Costo R, de la Presa P, Serna CJ, et al. Magnetic nanoparticles for power absorption: Optimizing size, shape and magnetic properties. *J Solid State Chem.* 2009;182(10):2779–84.
203. R: E.Rosensweig*. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *J Magn Magn Mater* 252 Heat. 2002;370–374.
204. Illés E, Szekeres M, Tóth IY, Szabó Á, Iván B, Turcu R, et al. Multifunctional PEG-carboxylate copolymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for biomedical application. *J Magn Magn Mater* [Internet]. 2018;451:710–20.
205. Atkinson WJ, Brezovich IA, Chakraborty DP. Usable Frequencies in Hyperthermia with Thermal Seeds. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1984;BME-31(1):70–5.
206. Kandasamy G, Sudame A, Maity D, Soni S, Sushmita K, Veerapu NS, et al. Multifunctional magnetic-polymeric nanoparticles based ferrofluids for multimodal in vitro cancer treatment using thermotherapy and chemotherapy. *J Mol Liq* [Internet]. 2019;293:111549.
207. Baldi G, Lorenzi G, Ravagli C. Hyperthermic effect of magnetic nanoparticles under electromagnetic field. *Process Appl Ceram.* 2009;3(1–2):103–9.
208. Kumar CSSR, Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(9):789–808.
209. Sundrarajan M, Ramalakshmi M. Novel cubic magnetite nanoparticle synthesis using room temperature ionic liquid. *E-Journal Chem.* 2012;9(3):1070–6.
210. Cha YJ, Kim MJ, Choa YH, Kim J, Nam B, Lee J, et al. Synthesis and characterizations of surface-coated superparamagnetic magnetite nanoparticles. In: *IEEE Transactions on Magnetism.* 2010. p. 443–6.
211. Chen ZP, Zhang Y, Zhang S, Xia JG, Liu JW, Xu K, et al. Preparation and characterization of water-soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double-exchange with DMSA. Vol. 316, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2008. p. 210–6.
212. Georgiadou V, Makris G, Papagiannopoulou D, Vourlias G, Dendrinou-Samara C. Octadecylamine-Mediated Versatile Coating of CoFe₂O₄ NPs for the Sustained Release of Anti-Inflammatory Drug Naproxen and in Vivo Target Selectivity. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(14):9345–60.
213. Sandiford L, Phinikaridou A, Protti A, Meszaros LK, Cui X, Yan Y, et al. Bisphosphonate-anchored pegylation and radiolabeling of superparamagnetic iron oxide: Long-circulating nanoparticles for in vivo multimodal (T1 MRI-SPECT) imaging. *ACS Nano.* 2013;7(1):500–12.
214. Reddy LH, Sharma RK, Chuttani K, Mishra AK, Murthy RR. Etoposide-incorporated tripalmitin nanoparticles with different surface charge: Formulation, characterization, radiolabeling, and biodistribution studies. *AAPS J.* 2004;6(3).
215. H. V. Repetto-Llamazares A, H. Larsen R, Mollatt C, Lassmann M, Dahle J. Biodistribution and Dosimetry of ¹⁷⁷Lu-tetumomab, a New Radioimmunoconjugate for Treatment of Non-Hodgkin Lymphoma. *Curr Radiopharm.* 2013;6(1):20–7.

216. Cheng YH, He C, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA, Lin Z. Meta-Analysis of Nanoparticle Delivery to Tumors Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling and Simulation Approach. *ACS Nano*. 2020;14(3):3075–95.
217. Chen Y, Hou S. Recent progress in the effect of magnetic iron oxide nanoparticles on cells and extracellular vesicles. *Cell Death Discov*. 2023;9(1):1–7.
218. Reigstad I, Smeland HYH, Skogstrand T, Sortland K, Schmid MC, Reed RK, et al. Stromal integrin $\alpha 11\beta 1$ affects RM11 prostate and 4T1 breast xenograft tumors differently. *PLoS One*. 2016;11(3):1–17.
219. Burmakin M, Wieringen T, Olsson PO, Stuhr L, Åhgren A, Heldin CH, et al. Imatinib increases oxygen delivery in extracellular matrix-rich but not in matrix-poor experimental carcinoma. *J Transl Med*. 2017;15(1):1–9.
220. Salvanou EA, Kolokithas-Ntoukas A, Prokopiou D, Theodosiou M, Efthimiadou E, Koźmiński P, et al. 177Lu-Labeled Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with Doxorubicin and Bevacizumab as Nanobrachytherapy Agents against Breast Cancer. *Molecules*. 2024;29(5).
221. Nuclear Medicine, Molecular Imaging, and Theranostics: Revolutionizing Healthcare <https://snmmi.org/Web/News/Articles/Nuclear-Medicine--Molecular-Imaging--and-Theranostics--Revolutionizing-Healthcare.aspx>.
222. Jiang Z, Fu Y, Shen H. Development of Intratumoral Drug Delivery Based Strategies for Antitumor Therapy. *Drug Des Devel Ther*. 2024;18(June):2189–202.
223. Vilchis-Juárez A, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas C, Morales-Avila E, Ocampo-García B, Díaz-Nieto L, et al. Molecular targeting radiotherapy with Cyclo-RGDfK(C) peptides conjugated to 177Lu-labeled gold nanoparticles in tumor-bearing mice. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(3):393–404.
224. Cai Z, Yook S, Lu Y, Bergstrom D, Winnik MA, Pignol JP, et al. Local Radiation Treatment of HER2-Positive Breast Cancer Using Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with 177Lu. *Pharm Res [Internet]*. 2017;34(3):579–90.
225. Pouget JP, Lozza C, Deshayes E, Boudousq V, Navarro-Teulon I. Introduction to radiobiology of targeted radionuclide therapy. *Front Med*. 2015;2(MAR):12.
226. Pouget JP, Santoro L, Piron B, Paillas S, Ladjohounlou R, Pichard A, et al. From the target cell theory to a more integrated view of radiobiology in Targeted radionuclide therapy: The Montpellier group's experience. *Nucl Med Biol*. 2022;104–105:53–64.
227. Constanzo J, Faget J, Ursino C, Badie C, Pouget JP. Radiation-Induced Immunity and Toxicities: The Versatility of the cGAS-STING Pathway. *Front Immunol*. 2021;12(May):1–17.
228. Carvalho H de A, Villar RC. Radiotherapy and immune response: The systemic effects of a local treatment. *Clinics*. 2018;73.
229. Mohamed K. Khan, M.D, Ph.D, Leah D. Minc, Ph.D.2, Shraddha S. Nigavekar PD, Muhammed S. T. Kariapper, Ph.D, Bindu M. Nair, Ph.D, Matthew Schipper, Ph.D. A, C. Cook, Ph.D, Wojciech G. Lesniak, Ph.D, and Lajos P. Balogh PD. Fabrication of {198Au0} radioactive composite nanodevices and their use for nano-brachytherapy. *NIH Public Access*. 2008;4(1):57–69.

230. Hruby M, Pouckova P, Zadinova M, Kucka J, Lebeda O. 1. Hruby M, Pouckova P, Zadinova M, Kucka J, Lebeda O. Thermoresponsive polymeric radionuclide delivery system - An injectable brachytherapy. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2011;42(5):484–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2011.02.002>Thermor. *Eur J Pharm Sci*. 2011;42(5):484–8.
231. Chakravarty R, Chakraborty S, Guleria A, Shukla R, Kumar C, Vimalnath Nair K V, et al. Facile One-Pot Synthesis of Intrinsically Radiolabeled and Cyclic RGD Conjugated ¹⁹⁹Au Nanoparticles for Potential Use in Nanoscale Brachytherapy. *Ind Eng Chem Res*. 2018;57(43):14337–46.
232. Salvanou EA, Stellas D, Tsoukalas C, Mavroidi B, Paravatou-petsotas M, Kalogeropoulos N, et al. A proof-of-concept study on the therapeutic potential of au nanoparticles radiolabeled with the alpha-emitter actinium-225. *Pharmaceutics*. 2020;12(2):1–15.
233. Yook S, Cai Z, Lu Y, Winnik MA, Pignol JP, Reilly RM. Intratumorally injected ¹⁷⁷Lu-labeled gold nanoparticles: Gold nanoseed brachytherapy with application for neoadjuvant treatment of locally advanced breast cancer. *J Nucl Med*. 2016;57(6):936–42.
234. Arts JHE, Humfrey CD, Slotter ED. Letter to the Editors regarding “10% body weight (gain) change as criterion for the maximum tolerated dose: A critical analysis.” *Regul Toxicol Pharmacol*. 2023;143.
235. OECD. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. Assessment. 2000.
236. Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem Rev*. 2012;112(11):5818–78.
237. Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2011;103(2):317–24.
238. Yu X, Ma H, Xu G, Liu Z. Radiotherapy assisted with biomaterials to trigger antitumor immunity. *Chinese Chem Lett* [Internet]. 2022;33(9):4169–74.
239. Bakker RC, Lam MGEH, van Nimwegen SA, Rosenberg AJWP, van Es RJJ, Nijssen JFW. Intratumoral treatment with radioactive beta-emitting microparticles: a systematic review. *J Radiat Oncol*. 2017;6(4):323–41.
240. Bodei L, Cremonesi M, Ferrari M, Pacifici M, Grana CM, Bartolomei M, et al. Long-term evaluation of renal toxicity after peptide receptor radionuclide therapy with ⁹⁰Y-DOTATOC and ¹⁷⁷Lu-DOTATATE: The role of associated risk factors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35(10):1847–56.
241. Liu Q, Tan Q, Zheng Y, Chen K, Qian C, Li N, et al. Blockade of fas signaling in breast cancer cells suppresses tumor growth and metastasis via disruption of

- fas signaling-initiated cancer-related inflammation. *J Biol Chem* [Internet]. 2014;289(16):11522–35.
242. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* [Internet]. 2014;158(5):1110–22.
243. Gao ZG, Tian L, Hu J, Park IS, Bae YH. Prevention of metastasis in a 4T1 murine breast cancer model by doxorubicin carried by folate conjugated pH sensitive polymeric micelles. *J Control Release* [Internet]. 2011;152(1):84–9.
244. <https://www.creative-biogene.com/support/CT26.html>, datum pristupa 12.2024.
245. Lechner MG, Karimi SS, Barry-Holson K, Angell TE, Murphy KA, Church CH, et al. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *J Immunother*. 2013;36(9):477–89.
246. Ayeka PA, Bian YH, Githaiga PM, Zhao Y. The immunomodulatory activities of licorice polysaccharides (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) in CT 26 tumor-bearing mice. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):1–9.
247. Saltz LB, Minsky B. Adjuvant therapy of cancers of the colon and rectum. *Surg Clin North Am*. 2002;82(5):1035–58.
248. Allal AS, Kähne T, Reverdin AK, Lippert H, Schlegel W, Reymond MA. Radioresistance-related proteins in rectal cancer. *Proteomics*. 2004;4(8):2261–9.
249. Rasaneh S, Rajabi H, Babaei MH, Johari Daha F. Synthesis and biodistribution studies of ¹⁷⁷Lu-trastuzumab as a therapeutic agent in the breast cancer mice model. *J Label Compd Radiopharm*. 2010;53(9):575–9.
250. Richard Baum, Xin Fan, Fei Yu, Christiane Schuchard, Xiaoyuan Chen JZ. Long-term nephrotoxicity after PRRT, Myth or Reality. 2024.451–9.
251. Shakeri-Zadeh A, Khoee S, Shiran MB, Sharifi AM, Khoei S. Synergistic effects of magnetic drug targeting using a newly developed nanocapsule and tumor irradiation by ultrasound on CT-26 tumors in BALB/c mice. *J Mater Chem B*. 2015 Mar;3(9):1879–87.
252. Nitipir C, Niculae D, Orlov C, Barbu MA, Popescu B, Popa AM, et al. Update on radionuclide therapy in oncology. *Oncol Lett*. 2017;14(6):7011–5.
253. Koziorowski J, Ballinger J. Theragnostic radionuclides: a clinical perspective. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2021;65(4):306–14.
254. Kadhim M, Tuncay Cagatay S, Elbakrawy EM. Non-targeted effects of radiation: a personal perspective on the role of exosomes in an evolving paradigm. *Int J Radiat Biol*. 2022;98(3):410–20.
255. Enger SA, Hartman T, Carlsson J, Lundqvist H. Cross-fire doses from β -emitting radionuclides in targeted radiotherapy. A theoretical study based on experimentally measured tumor characteristics. *Phys Med Biol*. 2008;53(7):1909–20.
256. Lelekakis M, Moseley JM, Martin TJ, Hards D, Williams E, Ho P, et al. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis*. 1999;17(2):163–70.

Biografija autora

Dragana Stanković rođena je 21.01.1980. godine u Beogradu. Osnovnu školu „Vojvoda Mišić” i XII Beogradsku gimnaziju završila je kao nosilac diplome „Vuk Karadžić”.

Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1999. godine, na kome je 2007. godine diplomirala sa prosečnom ocenom 8,81 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Tema diplomskog rada bila je “Etiologija i patogeneza malarije”. Pripravnički staž obavila je u apotekarskoj ustanovi “Beograd” u Beogradu u toku 2007/2008. godine, nakon čega je položila stručni ispit za diplomirane farmaceute u decembru 2008. godine.

Od avgusta 2009. godine, zaposlena je u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“, u Laboratoriji za radioizotope, gde i danas radi na poziciji Odgovorne osobe za puštanje serije leka u promet (QP).

Doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu, modul Farmakologija, upisala je 2009. godine. U okviru planom predviđenog programa, položila je kurs „Principi rada sa eksperimentalnim životinjama” na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, čime je stekla pravo obavljanja ogleda na životinjama u sklopu svog naučnoistraživačkog rada.

Specijalističke akademske studije Farmacija 3 – Puštanje leka u promet, upisane školske 2015/2016. završila je 2017. godine. Odbranom završnog rada pod nazivom: „Radiofarmaceutski lekovi u propisima o lekovima Evropske unije i Republike Srbije, stekla je zvanje Specijaliste farmacije.

Specijalističke akademske studije Industrijska farmacija završila je 2018. godine, odbranom završnog rada pod naslovom $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generator Laboratorije za radioizotope Instituta „Vinča“- od razvoja do danas.

Autor ili koautor je 5 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 2 rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), 3 rada u Međunarodnim časopisima (M23), kao i brojnih saopštenja sa međunarodnih i domaćih skupova.

Образац 5.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Драгана Станковић

Број индекса 9/09

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Развој обложених суперпарамагнетних наночестица обележених ^{99m}Tc и ^{177}Lu и испитивање њихове ефикасности на експерименталном моделу карцинома дојке и колоне

- 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, 12.02.2025.

Dragana Stanković

Образац 6.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Драгана Станковић

Број индекса 9 09

Студијски програм модул Фармакологија

Наслов рада Развој обложених суперпарамагнетних наночестица обележених ^{99m}Tc и ^{177}Lu и испитивање њихове ефикасности на експерименталном моделу карцинома дојке и колона

Ментори: редовни професор др Мирослав Савић и
виши научни сарадник др Магдалена Радовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена 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, 12.02.2025.

Dragana Stanković

Образац 7.

Изјава о коришћењу

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

Развој обложених суперпарамагнетних наночестица обележених ^{99m}Tc и ^{177}Lu и испитивање њихове ефикасности на експерименталном моделу карцинома дојке и колона

која је моје ауторско дело.

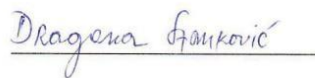
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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, 12.02.2025.