

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Maja Misirkić Marjanović

**Mehanizmi citotoksičnog i  
citoprotektivnog dejstva fulerenskih  
(C<sub>60</sub>) nanočestica**

**doktorska disertacija**

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Maja Misirkić Marjanović

**The mechanism of cytotoxic and  
cytoprotective effects of fullerene (C<sub>60</sub>)  
nanoparticles**

**Doctoral Dissertation**

Belgrade, 2015

## **MENTOR**

Prof. dr Vladimir Trajković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

## **ČLANOVI KOMISIJE:**

Prof. dr Aleksandra Isaković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Naučni sav. dr Zoran Marković, Institut za nuklearne nauke Vinča, Beograd

Doc. dr Vladislav Volarević, Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u  
Kragujevcu

## ZAHVALNICA

*Ova doktorska teza je urađena u Laboratoriji za imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu*

*Zahvaljujem se:*

*prof. dr Vladimiru Trajkoviću na neposrednom rukovođenju pri izradi i pisanju doktorske teze i radova koji su iz nje proistekli,*

*dr Ljubici Harhaji-Trajković na podršci i pomoći pri pisanju teze,*

*dr Zoranu Markoviću na korisnim savetima pri pisanju teze,*

*prof. dr Aleksandri Isaković na pomoći u eksperimentalnom radu i korisnim savetima pri pisanju teze,*

*dr Ljubici Vučićević i dr Kristini Janjetović na dugogodišnjoj prijateljskoj saradnji, pomoći pri eksperimentalnoj izradi i iskrenoj podršci pri pisanju disertacije,*

*dr Verici Paunović, dr Neveni Zogović, dr Gordani Tovilović, Biljani Ristić, Milici Kosić i dr Marini Milenković na iskrenoj podršci pri pisanju disertacije,*

*svim kolegamicama i kolegama koji su neposredno doprineli uspešnom završetku ove doktorske disertacije i*

*mojoj majci i suprugu koji su mi pružili bezgraničnu podršku i razumevanje prilikom izrade disertacije..i mojoj dečici što svemu daju smisao.*

## Mehanizmi citotoksičnog i citoprotektivnog dejstva fullerenskih (C<sub>60</sub>) nanočestica

### REZIME

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani su citotoksični efekti koloidnih rastvora fullerenskih nanočestica, kao i uticaj mehanohemijски pripremljenih fulerena na citotoksičnost azot monoksida. Zbog sposobnosti da indukuju ćelijsku smrt u određenim uslovima, fulereni C<sub>60</sub> predstavljaju potencijalne antitumorske i toksične agense. Koloidni rastvor kristalnog C<sub>60</sub> (nC<sub>60</sub>) je izuzetno toksičan, ali mehanizmi njegove citotoksičnosti još uvek nisu dovoljno ispitani ni razjašnjeni. U ovoj studiji korišćena su tri različita načina pripreme nC<sub>60</sub> rastvora: 1. metodom izmene rastvarača u tetrahidrofuranu (THF/nC<sub>60</sub>), 2. etanolu (EtOH/nC<sub>60</sub>) ili 3. produženim mešanjem u vodi (H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub>). Kombinovanjem eksperimentalnih analiza i matematičkog modelovanja ispitivani su uslovi pod kojim različiti rastvori nC<sub>60</sub> ispoljavaju citotoksičnost posredovanu reaktivnim kiseoničkim vrstama (RKV). Prema sposobnosti da generišu RKV i izazovu mitohondrijalnu depolarizaciju praćenu nekrozom, rastvori nC<sub>60</sub> su rangirani sledećim redosledom: THF/nC<sub>60</sub> > EtOH/nC<sub>60</sub> > H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub>. Matematičko modelovanje produkcije singletnog kiseonika (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) pokazuje da sposobnost rastvarača ugrađenog u strukturu fullerenskog kristala da neutrališe <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (THF/nC<sub>60</sub> < EtOH/nC<sub>60</sub> < H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub>) predstavlja presudni faktor koji određuje sposobnost nanočestice da proizvodi RKV i izaziva ćelijsko oštećenje. Ovi rezultati skreću pažnju na toksikološki aspekt koloidnih fulerena u njihovoj potencijalnoj upotrebi u biomedicini.

Fulereni imaju dvojnju prirodu tako da osim što proizvode RKV kada su pobuđeni vidljivom svetlošću, oni deluju i kao „skupljači“ slobodnih radikala i ispoljavaju značajna antioksidativna svojstva. Iz tog razloga je, u drugom delu studije, ispitivan uticaj fullerenskih nanočestica na citotoksičnost azot monoksida (NO), veoma reaktivnog slobodnog radikala. Fullerenske nanočestice su pripremljene mehanohemijски potpomognutom kompleksacijom uz korišćenje anjonskog surfaktanta natrijum dodecil sulfata (SDS), makrocikličnog oligosaharida  $\alpha$ -ciklodekstrina ( $\gamma$ CDX) ili kopolimera acetat-etilen vinil versatata (EVA-EVV) i karakterisane metodama UV-vis

spektroskopije i mikroskopijom atomskih sila (AFM). Iako je pokazano da mišji fibroblasti L929 internalizuju C<sub>60</sub> nanočestice, one nisu bile citotoksične, već su i delimično štatile L929 ćelije od citotoksičnog efekta NO donora kao što su natrijum nitroprusid (SNP), S nitrozo-N-acetilpenicilamin (SNAP), S –nitrosoglutation (GSNO) i 3-morfolino-sidonimin (SIN-1). C<sub>60</sub> nanočestice su smanjile apoptotsku smrt ćelija tretiranih NO donorom inhibicijom depolarizacije mitohondrijalne membrane, aktivacije kaspaza i posledične fragmentacije DNK. Protektivno dejstvo nanočestica C<sub>60</sub> nije zavisilo od direktne interakcije sa NO-om, nego od neutralizacije superoksid anjona nastalog u mitohondrijama ćelija tretiranih NO donorom, što je pokazano korišćenjem više različitih redoks senzitivnih fluorescentnih boja. Ovi podaci ukazuju na moguću upotrebu kompleksa C<sub>60</sub> sa odgovarajućim molekulima u sprečavanju ćelijskih oštećenja izazvanih azot monoksidom u zapaljenskim i autoimunskim oboljenjima.

**Ključne reči:** Nanočestice; Citotoksičnost; Slobodni radikali; Azot monoksid; Apoptoza

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

UDK broj:

## **The mechanism of cytotoxic and cytoprotective effects of fullerene (C<sub>60</sub>) nanoparticles**

### **SUMMARY**

In this doctoral dissertation we investigated cytotoxic effects of fullerene colloidal suspensions, as well as the influence of mechanochemically synthesized fullerene C<sub>60</sub> nanoparticles on the cytotoxicity of nitric oxide (NO). Because of their ability to induce cell death in certain conditions, fullerenes are potential toxic and anticancer agents. Colloidal suspension of crystalline C<sub>60</sub> (nC<sub>60</sub>) is very toxic, but the mechanisms of its cytotoxicity are not completely explained. By combining experimental analysis and mathematical modeling, the requirements for the reactive oxygen species (ROS)-mediated cytotoxicity of different nC<sub>60</sub> suspensions were investigated. Colloidal suspensions of nC<sub>60</sub> were prepared by solvent exchange method in tetrahydrofuran (THF/nC<sub>60</sub>) and ethanol (EtOH/nC<sub>60</sub>), or by extended mixing in water (H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub>). With regard to their capacity to generate R<sub>1</sub>KV and cause mitochondrial depolarization followed by necrotic cell death, the nC<sub>60</sub> suspensions were ranked in the following order: THF/nC<sub>60</sub> > EtOH/nC<sub>60</sub> > aqu/nC<sub>60</sub>. Mathematical modeling of singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) generation indicates that the <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-quenching power (THF/ nC<sub>60</sub> < EtOH/nC<sub>60</sub> < H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub>) of the solvent intercalated in the fullerene crystals determines their ability to produce ROS and cause cell damage. These results could have important implications for the toxicology and biomedical application of colloidal fullerenes.

Fullerenes are molecules with dual properties, able to produce ROS when photoexcited, but also to scavenge free radicals and exert antioxidant action. In order to assess the latter, the influence of fullerene C<sub>60</sub> nanoparticles on the cytotoxicity of a highly reactive free radical nitric oxide (NO) was investigated. Fullerene nanoparticles were prepared by mechanochemically assisted complexation with anionic surfactant sodium dodecyl sulfate, macrocyclic oligosaccharide  $\gamma$ -cyclodextrin or the copolymer ethylene vinyl acetate–ethylene vinyl versatate, and characterized by UV–vis and atomic force microscopy (AFM). While readily internalized by mouse L929 fibroblasts,

C<sub>60</sub> nanoparticles displayed no cytotoxicity. Moreover, they partially protected L929 cells from the cytotoxic effect of NO-releasing compounds sodium nitroprusside (SNP), S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), S-nitrosoglutathione (GSNO) and 3-morpholino-sydnonimine (SIN-1). C<sub>60</sub> nanoparticles lowered the extent of SNP-induced apoptotic cell death by preventing mitochondrial depolarization, caspase activation, and subsequent DNA fragmentation. C<sub>60</sub> nanoparticles exerted their protective action through neutralization of mitochondria-produced superoxide radical in NO-treated cells, rather than through direct interaction with NO, as demonstrated by using different redox-sensitive reporter fluorochromes. These data suggest that C<sub>60</sub> complexes with appropriate host molecules could be used for preventing NO-mediated cell injury in inflammatory and autoimmune disorders.

**Keywords:** Nanoparticles; Cytotoxicity; Free radicals; Nitric oxide; Apoptosis

**Research area:** Medicine

**Research field:** Molecular medicine

UDC number:



## SADRŽAJ

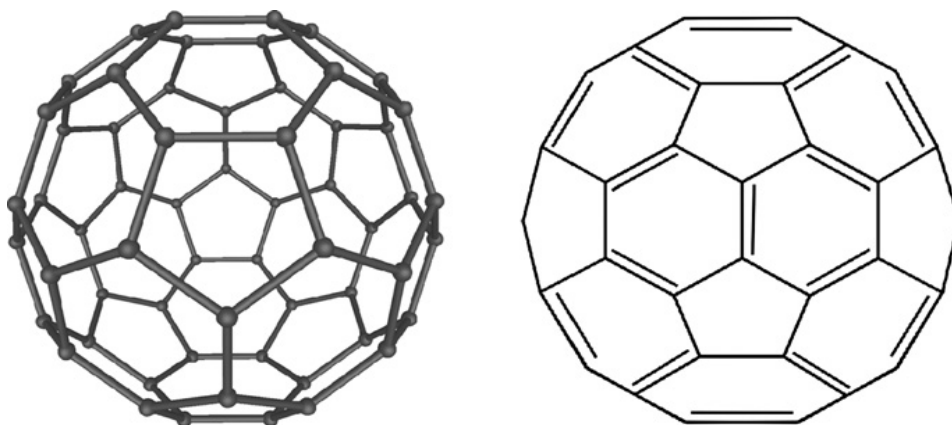
1. UVOD.....	1
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	12
3. MATERIJAL I METODE .....	13
3.1. Ćelije i ćelijske kulture .....	13
3.2. Priprema i karakterizacija fullerenskih nanoćestica.....	14
3.2.1 Priprema nanoćestica metodom zamene rastvaraća i mehanohemijskom metodom.....	14
3.2.2 Karakterizacija fullerenskih nanoćestica.....	15
3.2.3 Matematičko modelovanje produkcije singlet kiseonika od strane nC <sub>60</sub> .....	16
3.3. Rastvori i reagensi.....	18
3.4. Testovi vijabiliteta .....	18
3.4.1. MTT test.....	19
3.4.2. Kristal violet test .....	19
3.4.3. LDH test.....	20
3.5. Analiza parametara ćelijske smrti .....	21
3.5.1. Određivanje apoptoze i nekroze.....	21
3.5.2. Određivanje fragmentacije DNK .....	22
3.5.3. Određivanje aktivacije kaspaza.....	22
3.5.4. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije.....	23
3.5.5. Određivanje nivoa depolarizacije mitohondrija.....	23
3.6. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta .....	24
3.6.1. Određivanje produkcije RKV u uslovima sa ćelijama.....	24
3.6.2. Određivanje produkcije RKV i RAV u vodenom rastvoru.....	25

3.7. Ispitivanje morfologije ćelija u kulturi .....	26
3.8. Statistička analiza.....	26
4. REZULTATI .....	27
4.1. Karakterizacija koloida nC <sub>60</sub> .....	27
4.2. Citotoksičnost nC <sub>60</sub> zavisi od rastvarača koji se koristi za njihovu pripremu ..	28
4.3. THF/nC <sub>60</sub> izaziva nekrozu NTCC ćelija.....	30
4.4. THF/nC <sub>60</sub> dovodi do depolarizacije mitohondrijalne membrane NTCC ćelija ...	31
4.5. nC <sub>60</sub> proizvode RKV u medijumu bez ćelija .....	33
4.6. THF/nC <sub>60</sub> indukuje oksidativni stres u NTCC ćelijama .....	35
4.7 Uloga RKV u citotoksičnosti nC <sub>60</sub> .....	36
4.8. Teorijska analiza produkcije RKV kod različitih fullerenskih koloida .....	38
4.9 THF/nC <sub>60</sub> izložen $\gamma$ -zračenju gubi sposobnost da proizvodi RKV i izaziva oštećenje ćelijske membrane.....	40
4.10. $\gamma$ / nC <sub>60</sub> pokazuje citoprotektivno svojstvo .....	42
4.11. Karakterizacija mehanohemijski pripremljenih fulerena.....	44
4.12. Mehanohemijski pripremljeni fulereni nisu citotoksični .....	45
4.13. Mehanohemijski sintetisane C <sub>60</sub> nanočestice inhibiraju ćelijsku smrt indukovanu NO-om .....	46
4.14 C <sub>60</sub> SDS smanjuje citotoksičnost NO donora .....	48
4.15. C <sub>60</sub> SDS smanjuje proapoptotsko dejstvo NO .....	49
4.16 C <sub>60</sub> SDS smanjuje depolarizaciju mitohondrija izazvanu NO-om.....	51
4.17. C <sub>60</sub> SDS smanjuje NO-om indukovanu aktivaciju kaspaza.....	52
4.18. Mehanohemijski pripremljeni fulereni smanjuju produkciju RKV i RAV u L929 ćelijama tretiranim SNP-om .....	53
4.19. C <sub>60</sub> SDS i C <sub>60</sub> CDX smanjuju produkciju superoksid anjona indukovanu SNP-om .....	54
4.20 C <sub>60</sub> SDS ne utiče na akumulacija nitrita u vodenom rastvoru SNP i GSNO .....	55

4.21 C <sub>60</sub> SDS ne utiče na koncentraciju NO u vodenom rastvoru SNP.....	56
4.22 C <sub>60</sub> SDS smanjuje produkciju RKV i RAV u vodenom rastvoru SIN-1 .....	57
5. DISKUSIJA .....	59
6. ZAKLJUČCI .....	69
7. LITERATURA.....	70
BIOGRAFIJA.....	79

# 1.UVOD

Molekul fullerena je otkriven tokom eksperimenata kojim je trebalo da se utvrdi na koji način nastaju ugljenični molekuli dugog lanca u međuzvezdanom prostoru. Harold Kroto (Harold W. Kroto), britanski fizičar sa univerziteta u Saseksu, i Robert Krl (Robert F. Curl) i Ričard Smejli (Richard E. Smalley) sa Rajs univerziteta iz Hjustona su 1985. godine utvrdili da uparavanjem grafita laserskim zračenjem nastaje izuzetno stabilan molekul, građen od 60 ugljenikovih atoma (Kroto, Heath i sar., 1985). S obzirom na superstabilnost ovog molekula, predložili su strukturu u obliku skraćenog ikozaedra, odnosno fudbalske lopte. Zbog karakterističnog oblika  $C_{60}$ , predložili su da molekul bude nazvan po Ričardu Bakminster Fuleru (Richard Buckminster Fuller), američkom arhitekti i dizajneru, koji je šezdesetih godina dvadesetog veka projektovao geodetske kupole na koje je novootkriveni molekul podsećao. Za ovo otkriće su dobili Nobelovu nagradu 1996. godine. Fizičari Krečmer (W. Kratschmer) i Hafman (D.R. Huffman) su 1990. godine objavili jednostavnu tehniku za proizvodnju makroskopskih količina  $C_{60}$ , korišćenjem električnog luka između dve grafitne elektrode radi uparavanja ugljenika, u helijumskom okruženju. Dobijenu kondenzovanu paru su zatim rastvorili u organskom rastvaraču, pri čemu su dobijeni kristali  $C_{60}$  (Kratschmer, Lamb i sar., 1990). Na ovaj način, sa mogućnošću dobijanja dovoljnih količina  $C_{60}$  za analizu, omogućena su dalja ispitivanja ovih molekula, u različitim naučnim oblastima.



Slika 1. Struktura fullerena  $C_{60}$

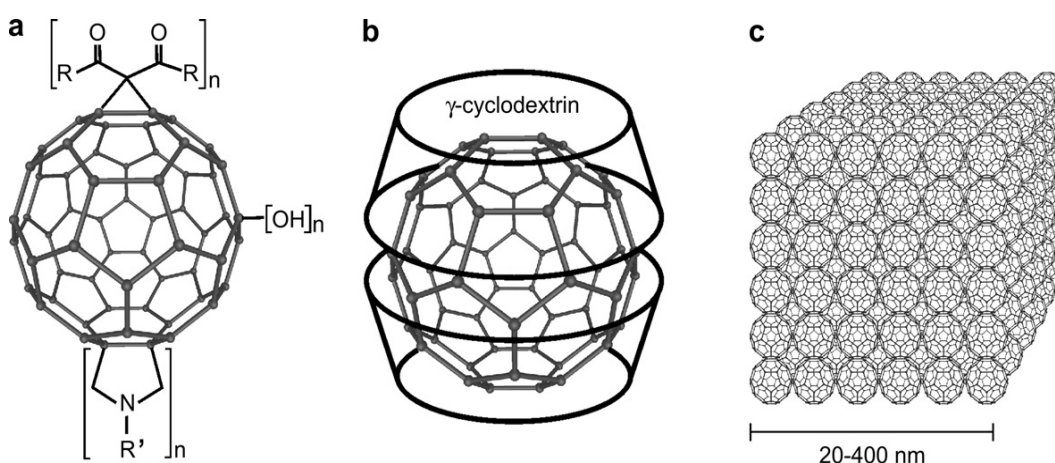
Familiju fulerena čine molekuli čiju strukturnu osnovu čini kavez građen od ugljenikovih atoma i oni predstavljaju treću alotropsku modifikaciju ugljenika. Najčešći oblik fulerena je bakminsterfuleren ( $C_{60}$ ) sa 60 ugljenikovih atoma organizovanih u obliku poznatom kao skraćeni ikozaedar. U njegovu strukturu ulazi 12 pentagona i 20 heksagona kod kojih je svaki atom ugljenika  $sp^2$  hibridizovan i vezan za tri susedna ugljenikova atoma (Kratschmer, Lamb i sar., 1990). U fulerenu postoje dva tipa veza, i to C5-C5 jednostruke veze u pentagonima i C5-C6 dvostruke veze u heksagonima.  $C_{60}$  nije superaromatičan zbog nedostatka dvostrukih veza u pentagonima, što dovodi do slabe delokalizacije elektrona i posledično velike reaktivnosti sa molekulima bogatim elektronima (Yadav i Kumar, 2008). Jedinственe fizičko-hemijske osobine fulerena  $C_{60}$ , najznačajnijeg predstavnika iz familije fulerena, otvorile su mogućnost njihove primene u različitim oblastima biomedicine. Jedna od najznačajnijih osobina  $C_{60}$ , gledano sa biološkog stanovišta, je njegova sposobnost da funkcioniše kao „sunder“ za slobodne radikale, te da poništava efekte slobodnih radikala efikasnije od poznatih antioksidanata (Krusic, Wasserman i sar., 1991). Ta osobina je pripisana sistemu delokalizovanih  $\pi$  orbitala u fulerenskom kavezu. Sa druge strane, osvetljavanje  $C_{60}$  vidljivom ili UV svetlošću dovodi do njegove fotoekscitacije i do prelaska u dugoživeće triplet ekscitovano stanje. Takvo stanje lako dovodi do prenosa energije na molekularni kiseonik, pri čemu nastaje singlet kiseonik ( $^1O_2$ ), izuzetno reaktivan molekul (Arbogast, Darmany i sar., 1991; Guldi i Prato, 2000). Za potencijalnu primenu fulerena  $C_{60}$  u biomedicini, neophodno je detaljno ispitivanje uzroka i uslova pod kojim se ispoljava njihova toksičnost posredovana produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV), jer bi to moglo negativno da utiče na njihovu upotrebu kao nosača lekova ili u proizvodima za široku potrošnju. Ispitivanja ovih problema su otežana izuzetno slabom rastvorljivošću fulerena  $C_{60}$  i činjenicom da različite metode rastvaranja menjaju fotofizičke osobenosti fulerena, kao i njihovu sposobnost da generišu ili anuliraju RKV. Fulereni su hidrofobni molekuli koji se najbolje rastvaraju u benzenima, naftalenima i alkanima, tako da je potencijalna upotreba u biomedicini otežana njihovom slabom rastvorljivošću u polarnim rastvaračima. Zato su razvijena četiri osnovna pristupa za rastvaranje fulerena u vodi:

1) hemijska modifikacija fullerenskog ugljeničkog jezgra dodavanjem različitih funkcionalnih grupa (na pr. OH, NH<sub>2</sub>, -COOH), kako bi fullerenski molekuli mogli da uspostave veze sa vodom preko hidrofilnih funkcionalnih adukata (Chiang, Wang i sar., 1994; Brettreich i Hirsch, 1998; Bosi, Feruglio i sar., 2004).

2) ugradnja fulerena u supramolekularne strukture korišćenjem surfaktanata i drugih modifikujućih agenasa kao što su kaliksareni i ciklodekstrini (Braun, Buvári-Barcza i sar., 1994; Janot, Bienvenue i sar., 2000; Deguchi, Mukai i sar., 2006; Makha, Purich i sar., 2006). U većini slučajeva fullerensko jezgro je potpuno prekriveno modifikujućim agensom i teško može da dođe u kontakt sa vodom.

3) metoda izmene rastvarača koja koristi isparljive organske rastvarače da bi se rastvorili fulereni. U sledećem koraku, po dodavanju vode, rastvarač se uparava ostavljajući fullerenske agregate u vodenom rastvoru (Deguchi, Alargova i sar., 2001; Fortner, Lyon i sar., 2005; Lyon, Adams i sar., 2006). Takođe, moguće je koristiti ultrazvučni tretman da bi se omogućio prenos fulerena iz nepolarnog rastvarača (na pr. toluena) u vodu (Andrievsky, Kosevich i sar., 1995; Brant, Labille i sar., 2006). Ova metoda ne dovodi do promene u strukturi fulerena i fullerensko jezgro može slobodno da dolazi u kontakt sa molekulima vode.

4) dugotrajno mešanje čistog C<sub>60</sub> u vodi (Brant, Labille i sar., 2006; Oberdörster, Zhu i sar., 2006). Iako ova metoda omogućava ispitivanje čistog C<sub>60</sub> u vodi, problem je u tome što nastaju veliki agregati, a koncentracija fulerena je niska.



**Slika 2. Shematski prikaz različitih tipova C<sub>60</sub> preparata:** a) derivatizovani preparati C<sub>60</sub> rastvorljivi u vodi; b)  $\gamma$ -ciklodekstrin/C<sub>60</sub> kompleks; c) C<sub>60</sub> nanokristali pripremljeni metodom izmene rastvarača ili sonifikacijom/mešanjem (Markovic i Trajkovic, 2008).

Sam molekul fulerena je manji od nanometra, prečnik mu je oko 0,7 nm, ali sve metode, osim derivatizacije fulerena, uglavnom dovode do formiranja fulerenskih čestica koje su nanodimenzija, sa veličinama od nekoliko desetina do nekoliko stotina nanometara. Fulereni imaju prooksidativna svojstva i mogu da proizvedu različite RKV, ali najbolje je ispitana produkcija singlet kiseonika i superoksid anjona. Jedinstvena elektronska konfiguracija molekularnog kiseonika otvara mogućnost nastanka tri energetski slična elektronska stanja:  $\Sigma$  triplet osnovnog,  $\Sigma$  triplet ekscitovanog i  $\Delta$  singlet stanja.  $\Delta$  singlet, u kome su oba elektrona sparena u u jednoj orbitali, ima nižu energiju ali značajno duži životni vek nego  $\Sigma$  triplet ekscitovano stanje (Mulliken, 1928). Zbog svoje izuzetno visoke oksidativne moći, singlet kiseonik učestvuje u čitavom nizu hemijskih i biohemijskih reakcija (Briviba, Klotz i sar., 1997). Fotosenzitizacija je najčešći način na koji nastaje singlet kiseonik. To je proces u kom dolazi do prenosa energije sa fotosenzitivnog molekula, koji je prethodno apsorbovao svetlost u određenom delu spektra, na kiseonik u triplet osnovnom stanju (Clo, Snyder i sar., 2007). Nastanak singlet kiseonika se često dešava u prirodi jer su ekscitacione energije triplet i singlet kiseonika mnogo niže od triplet energije drugih organskih molekula, a i male dimenzije molekularnog kiseonika omogućavaju njegovu brzu difuziju kroz razne medijume. Broj nastalih singlet kiseonika po fotonu apsorbovane svetlosti je najvažnija mera efikasnosti nekog fotosenzitizera. Fulereni su ekstremno efikasni generatori singlet kiseonika sa prinosom  $^1\text{O}_2$  koji je blizu broja jedan, što praktično znači da generišu singlet kiseonik za svaki foton koji apsorbuju. Oni apsorbuju intenzivno u UV oblasti i nešto manje u vidljivom delu spektra (Leach, Vervloet i sar., 1992). Singlet ekscitovano stanje  $\text{C}_{60}$ , koje prvo nastaje nakon svetlosne ekscitacije, prelazi u triplet stanje koje u kontaktu sa molekularnim kiseonikom generiše velike količine singlet kiseonika (Arbogast, Darmanyán i sar., 1991). Triplet ekscitovano stanje je dobar akceptor elektrona i lako dovodi do prebacivanja elektrona na molekularni kiseonik pri čemu nastaje superoksid anjon radikal (Yamakoshi, Sueyoshi i sar., 1998). Ova vrsta reakcije, za razliku od generisanja singlet kiseonika koja se obično javlja kod organskih rastvarača (benzen ili toluen), se prvenstveno javlja kod polarnih rastvarača i to posebno u prisustvu redukujućih agenasa kao što je NADH (Yamakoshi, Umezawa i sar., 2003). Ova dva puta, nastanak superoksid anjona i singlet kiseonika su analozi dve najvažnije fotohemijske reakcije poznate kao fotohemijski mehanizmi Tip I (transfer fotohemijski

naelektrisanja) i Tip II (transfer energije). Superoksid anjon radikal ( $O_2^-$ ) je slobodni radikal koji se najviše proizvodi u biološkim sistemima i najbolje je proučen. Fagociti, kao što su makrofagi i neutrofilni su značajni izvori superoksid anjona u organizmu. U prisustvu patogena kao što su bakterije, fagociti se aktiviraju i proizvode  $O_2^-$  koji deluje protiv patogena kao deo urođenog imunskog odgovora (Victor, Rocha i sar., 2004). Ovaj molekul je važan jer može da generiše druge slobodne radikale koji mogu da dovedu do ćelijskog oštećenja (Cadenas, 2004; Pacher, Beckman i sar., 2007). Na ćelijskom nivou, do njegovog formiranja može da dođe tokom oksidativne fosforilacije ili jednoelektronske redukcije molekularnog kiseonika u mitohondrijama (Lenaz, 2001). Molekularni kiseonik je biradikal koji sadrži dva nesparena elektrona sa paralelnim spinovima. Njegova potpuna redukcija do  $H_2O$  zahteva postepen prenos elektrona, što dovodi do nastanka superoksid anjona i drugih visokoreaktivnih intermedijera, uključujući  $H_2O_2$  (Aruoma, Halliwell i sar., 1991; Lenaz, 2001). Takođe, superoksid anjon se dobija i od ksantina delovanjem enzima ksantin oksidaze, kao nusproizvod metabolizma purina (Matesanz, Lafuente i sar., 2007). Ovaj izuzetno reaktivni anjon uglavnom utiče na aktivnost enzima (D'Autreaux i Toledano, 2007). Njegov mehanizam toksičnosti uključuje oslobađanje gvožđa i promene na  $-SH$  ostacima u gvožđe-sumpor proteinima čija je osnovna uloga u oksidaciono-redukcionim procesima u mitohondrijalnom transportu elektrona (Schrader i Fahimi, 2004). Superoksid anjon reaguje sa snažnim vazodilatatorom i ćelijskim signalnim molekulom, azot monoksidom (NO), pri čemu nastaje toksični peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) (Pacher, Beckman i sar., 2007). Takođe može da prođe kroz proces dismutacije i da formira vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), ili spontano ili dejstvom enzima superoksid dismutaze.

Nasuprot sposobnosti da stvaraju singlet kiseonik i superoksid anjon kada su fotoekscitovani, fulereni su i antioksidanti. Smatra se da su fulereni agensi koji imaju veliki potencijal za upotrebu u deaktivaciji različitih vrsta RKV (Bosi, Feruglio i sar., 2004). O fulerenima se govori kao o „sunderima“ za slobodne radikale, ali to nije u potpunosti odgovarajuće kada su u pitanju reaktivni kiseonički intermedijeri. Studija koja opisuje sposobnost fullerenskog jezgra da prihvati i do 34 slobodna radikala se bavila ugljeničnim, a ne kiseoničnim slobodnim radikalima (Krusic, Wasserman i sar., 1991). Ono što je zapravo pokazano je da sam fuleren ima veoma nisku stopu eliminisanja singlet kiseonika i da to zavisi od vrste rastvarača koji se koristi (Arbogast,



Darmanyan i sar., 1991; BLACK, #160 i sar., 1993). Antioksidativna svojstva fulerena se uglavnom odnose na derivatizovane forme ili fulerene pripremljene u kompleksima sa polimerima. Zbog sposobnosti da se vežu za mitohondrije i da anuliraju RKV efikasnije od uobičajeno korišćenih antioksidanata, fulereni rastvorljivi u vodi, kao što su polihidroksilovani fuleren C<sub>60</sub> (fulerol) ili karboksi-derivati C<sub>60</sub> predstavljaju pogodne kandidate za citoprotektivne antioksidativne terapije. Većina studija o citoprotektivnim efektima fulerena bavila se fullerolom ili karboksifulerenima, dok su citoprotektivne osobine fulerenskih nanočestica pripremljenih od čistog C<sub>60</sub> veoma retko ispitivane. Značaj detektovanja novih, efikasnijih antioksidanata je veliki jer je oksidativni stres medijator ćelijskog oštećenja u mnogim patološkim stanjima kao što su neurodegenerativna oboljenja (Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest, amiotrofična lateralna skleroza), dijabetes, ateroskleroza i autoimunska oboljenja (Droge, 2002). Neuronu su posebno osetljivi na štetne efekte oksidativnog stresa jer nervni sistem ima manji kapacitet da spreči oksidativno oštećenje.

Oksidativni stres se definiše kao stanje neravnoteže koje promovira proizvodnju RKV nasuprot antioksidativnim mehanizmima (Orrenius, Gogvadze i sar., 2007). Povećan nivo RKV dovodi, pored drugih pojava, do oksidacije tiol (-SH) grupa u proteinima i do promene u ćelijskom redoks signalingu (Kemp, Go i sar., 2008). Najveći deo RKV su proizvodi mitohondrijalne respiracije. Oko 1-2% molekularnog kiseonika koji se koristi tokom normalne ćelijske respiracije se pretvara u superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) za koji se može reći da je prekursor većine RKV. Mitohondrijalni transportni lanac elektrona sadrži nekoliko redoks centara iz kojih mogu da „cure“ elektroni do molekularnog kiseonika, predstavljajući primarni izvor produkcije superoksida u većini tkiva (Fariss, Chan i sar., 2005). Po nekim procenama, bazalna koncentracija O<sub>2</sub><sup>-</sup> u mitohondrijalnom matriksu je 5 do 10 puta veća nego u citosolu ili matriksu jedra (Cadenas i Davies, 2000). Superoksid dismutaza vrši dismutaciju superoksidnih anjona što dovodi do stvaranja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vodonik peroksid može kroz interakciju sa O<sub>2</sub><sup>-</sup> u Haber-Vajsovoj reakciji ili sa gvožđem u Fentonovoj reakciji da dovede do nastanka hidroksil radikala (·OH), koji je izuzetno reaktivan i može da oksiduje mitohondrijalne proteine, DNK i lipide i na taj način pojača efekte oksidativnog oštećenja izazvanog superoksid anjonom (Toninello, Salvi i sar., 2004). RKV generisane u mitohondrijama ili na drugim mestima u ćeliji mogu da oštete

ćelijske makromolekule, uključujući nukleinske kiseline, fosfolipide (oksidacija polinezasićenih masnih kiselina) i proteine (oksidacija SH grupa, formiranje proteinskih karbonilata i slično). U generisanju oksidativnog stresa učestvuju i reaktivne azotne vrste (RAV), posebno azot monoksid, koji može da se svrsta i u RKV. On je slobodni radikal koji je veoma reaktivan i potencijalno toksičan po ćelije. Kada se unutar ćelije sintetiše od L-arginina uz pomoć enzima iz familije NO-sintaza, NO brzo difunduje kroz vodu i membrane, od jedne ćelije do druge. Uključen je u niz fizioloških procesa kao što su relaksacija glatke muskulature, neurotransmisija, regulacija imunskog odgovora i odbrana domaćina od patogena i tumora. Sa druge strane, NO učestvuje u destrukciji ćelija domaćina u patološkoj inflamaciji tokom imunskog odgovora na patogene ili u autoimunskim poremećajima (Thippeswamy, McKay i sar., 2006). NO je veoma reaktivan i generiše čitav niz sekundarnih proizvoda kao što su nitrozonijum jon ( $\text{NO}^+$ ), peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), nitroksil anjon ( $\text{NO}^-$ ) i nitrozotoli. Ovi azotni slobodni radikali, uključujući NO, reaguju sa biomolekulima i dovode do oštećenja mitohondrija i DNK, lipidne oksidacije, promena u strukturi proteina i funkciji enzima, što može da dovede do ćelijske smrti apoptozom ili nekrozom (Brown i Borutaite, 2002).

Mitohondrijalna DNK predstavlja kritičnu metu u oksidativnom oštećenju ćelija. Ona je posebno osetljiva na uticaj RKV i RAV zbog blizine respiratornog lanca koji je centralno mesto za produkciju superoksid anjona, kao i zbog nedostatka protektivnih histona. Nivo oksidativne modifikacije baza u mitohondrijalnoj DNK je 10-20 puta veći nego u nuklearnoj DNK. Oksidativno oštećenje je verovatno glavni izvor nestabilnosti mitohondrijalnog genoma, koja dovodi do problema u funkciji respiratornog lanca. Važan mehanizam u toksičnosti superoksid anjona je direktna oksidacija i inaktivacija gvožđe-sumpor (Fe-S) proteina, kao što su akonitaze, i oslobađanja gvožđa kao posledice tog procesa (Fridovich, 1997). Inaktivacija mitohondrijalne akonitaze dovodi do istovremenog oslobađanja  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; glavnih učesnika Haber-Weiss-ove i Fentonove reakcije. Mitohondrijalna akonitaza igra važnu ulogu u Krebsovom ciklusu tako što katalizuje konverziju citrata u izocitrat, tako da njena inhibicija može da dovede do nefunkcionalnog Krebsovog ciklusa i do negativnog efekta na energetski balans i vijabilitet ćelije. Potencijalno štetan efekat oksidativnog stresa je olakšavanje  $\text{Ca}^{2+}$ -zavisnog povećanja propustljivosti mitohondrijalne membrane (*engl.* Mitochondrial Permeability Transition), koja igra ključnu ulogu u nekim modelima ćelijske smrti.

Osnovna jedinica MPT-pore (eng. Mitochondrial Permeability Transition Pore) je VDAC-ANT-CyP-D (voltažno zavisani anjonski kanal-adenin nukleotid translokaza-ciklofilin D) kompleks. Neke novije studije su identifikovale adenin nukleotid translokazu (ANT) kao važnu metu RKV u tretmanu antitumorskim lekovima kao što su doksorubicin i arsenik trioksid, koji su poznati induktori oksidativnog stresa (Simbre, Duffy i sar., 2005; Finsterer i Ohnsorge, 2013). Pokazano je da oštećenje kardiomiocita izazvano doksorubicinom korelira sa oksidacijom -SH grupa u ANT-u i smanjenju koncentracije ANT proteina, što dovodi do inhibicije mitohondrijalne respiracije i povećanja indukcije MPT. Ovi efekti oksidativnog stresa posle određenog vremena mogu da dovedu do indukcije ćelijske smrti.

Različiti tipovi ćelijske smrti su definisani na osnovu morfoloških kriterijuma, dok su njihovi biohemijski korelati nešto slabije proučeni. U svim ćelijama sisara, osim nekroze kao iznenadnog i nekontrolisanog ćelijskog umiranja, postoji i programirani put ćelijske smrti. Apoptoza, koju su prvi imenovali Kerr i saradnici 1972. godine (Kerr, Wyllie i sar., 1972), predstavlja posebnu vrstu ćelijske smrti (programirana ćelijska smrt I tipa) koju karakteriše zaokrugljivanje ćelija, smanjenje ćelijske zapremine (piknoza), kondenzacija hromatina, fragmentacija nukleusa, ali i očuvanje strukture ćelijske membrane sve do krajnjih stadijuma procesa. Postoje dva jasno definisana puta kroz koje se odvija aktivacija apoptotskog procesa, spoljašnji i unutrašnji. U spoljašnjem putu apoptotske signalizacije, vezivanje signala smrti za receptore (TNFR1, Fas i dr.) prati formiranje signalnih kompleksa indukovanih smrću (DISC) koji dovode do aktivacije kaspaza. Kaspaze su familija visoko konzerviranih cistein-zavisnih aspartat-specifičnih proteaza koje učestvuju u regulaciji i egzekuciji apoptoze. Sve kaspaze se nalaze u ćeliji kao inaktivni prekursori. DISC aktivira prokaspazu 8 koja direktno aktivira prokaspazu 3, a ona vrši kontrolisanu proteolizu i dovodi do apoptoze. U većini tipova ćelija kaspaza 8 prvo vrši proteolizu Bid, člana Bcl2 familije proteina, koji zatim indukuje translokaciju, oligomerizaciju i inserciju drugih članova Bcl2 familije proteina, Bax i/ili Bak, u spoljašnju mitohondrijalnu membranu (engl. outer mitochondrial membrane, OMM) (Schmitz, Walczak i sar., 1999). Usled toga dolazi do permeabilizacije mitohondrijalne membrane i oslobađanja nekoliko proteina iz mitohondrijalnog međumembranskog prostora. Jedan od njih je citohrom c, koji formira citosolni kompleks sa faktorom aktivacije apoptoze 1 (Apaf-1) i prokaspazom 9 u

prisustvu dATP. To dovodi do aktivacije kaspaze 9, koja aktivira prokaspazu 3 i druge efektorske kaspaze (Li, Nijhawan i sar., 1997). U unutrašnjem putu aktivacije apoptoze, signali smrti deluju direktno ili indirektno na mitohondrije, što dovodi do oslobađanja citohroma c i formiranja apoptozomalnog kompleksa. Ovaj put ćelijskog umiranja kontroliše više proteina. Regulaciju oslobađanja citohroma c vrši Bcl2 familija proteina, inhibiciju kaspaza vrše inhibitori apoptotskih proteina (IAPs) (Srinivasula, Hegde i sar., 2001), drugi mitohondrijalni aktivator kaspaza (Smac) (Du, Fang i sar., 2000) i HtrA/Omi koji vrše negativnu regulaciju IAP. Bcl2 familija proteina može da se podeli u dve grupe, pro i antiapoptotske članove. Važno je to da većina ovih članova svoju funkciju vrši na nivou mitohondrija (Cory, Huang i sar., 2003), tako da prisustvo Bcl2 ili BclXL sprečava permeabilizaciju OMM i oslobađanje proteina iz međumembranskog prostora, odnosno spasava ćeliju od umiranja. Sa druge strane, transkripciona ili posttranskripciona regulacija proapoptotskih članova ove familije, kao što su Bax ili Bak, vodi do njihove aktivacije preko BH3 proteina iz iste familije, kao što su Bid, Puma, Noxa. Aktivaciju Bax ili Bak karakteriše njihova oligomerizacija i ugradnja u OMM. U zavisnosti od toga koji proteini se oslobađaju iz mitohondrijalnog intermembranskog prostora ćelije mogu da umru putem koji zavisi ili ne zavisi od aktivacije kaspaza. Kod puta nezavisnog od kaspaza dolazi do oslobađanja bar tri proteina iz mitohondrija (faktor indukcije apoptoze AIF, endonukleaza G i HtrA2/Omi) i njihove translokacije u jedro. Lokalizacija AIF u jedru je povezana sa kondenzacijom hromatina i pojavom hromatinskih fragmenata velike molekulske težine. Dugo se smatralo da je MPT centralni mehanizam odgovoran za permeabilizaciju OMM. Otvaranje pora u IMM i dekuplovanje mitohondrija dovodi do aktivne hidrolize citosolnog ATP preko pojačane ATP-azne aktivnosti. Kao rezultat se javlja smanjena količina ATP koja dovodi do povećanja koncentracije kalcijuma ( $Ca^{2+}$ ) u citosolu i aktivacije kataboličkih enzima, proteaza, fosfolipaza, koje zavise od kalcijuma. Zato može da se kaže da je ovaj model OMM permeabilizacije najrelevantniji u slučaju lokalizovanog mitohondrijskog povećanja koncentracije  $Ca^{2+}$ . Neke studije preispituju značaj MPT u oslobađanju citohroma c iz mitohondrija pod apoptotskim uslovima. Pokazano je da u slučaju povećane ekspresije ciklofilina D, komponente MPT pore, dolazi do promocije nekroze dok je apoptoza inhibirana (Li, Johnson i sar., 2004). Takođe je pokazano da su ćelije sa isključenom ekspresijom ciklofilina D umirale

normalno pod uticajem različitih apoptotskih stimulusa, ali su bile otporne na nekrozu izazvanu oksidativnim stresom i povećanjem koncentracije kalcijuma (Baines, Kaiser i sar., 2005; Nakagawa, Shimizu i sar., 2005). Ovi podaci sugerišu da MPT, pored apoptotske ćelijske smrti, reguliše i neke oblike nekroze.

Nekrotična ćelijska smrt ili nekroza se morfološki karakteriše povećanjem ćelijskog volumena (onkoza), oticanjem organela, rupturom plazma membrane i sledstvenim oslobađanjem intracelularnog sadržaja (Kroemer, Galluzzi i sar., 2009). Opisan je niz mogućih uzroka, kao što su hipoksija, infekcije, fizički i hemijski agensi. Iako se uglavnom smatra da nekroza predstavlja slučajnu i nekontrolisanu ćelijsku smrt, pojavljuje se sve više dokaza da su egzekutivni mehanizmi nekrotične ćelijske smrti fino regulisani različitim signalnim putevima i kataboličkim mehanizmima (Festjens, Vanden Berghe i sar., 2006; Golstein i Kroemer, 2007). Nekoliko organela i ćelijskih procesa je uključeno u nekrotičnu ćelijsku smrt, ali je još uvek nejasno kako oni međusobno interaguju. Ovi fenomeni uključuju promene na mitohondrijama (dekuplovanje, produkciju RKV, nitrooksidativni stres azot monoksidom i MPT) (Nicotera, Bernassola i sar.), lizozomalne promene (produkcija RKV kroz Fentonovu reakciju, permeabilizaciju lizozomske membrane), zatim promene u nukleusu, lipidnu degradaciju (koja prati aktivaciju fosfolipaza, lipooksigenaza i sfingomijelinaza), povećanje citosolne koncentracije kalcijuma koje može da rezultuje u povećanju koncentracije  $Ca^{2+}$  u mitohondrijama i aktivaciji nekaspaznih proteaza kao što su kalpaini i katepsini (Nicotera i Melino, 2004; Golstein i Kroemer, 2007). Područje nekroze u tkivu je dobro ograničeno, a okolno tkivo razvija zapaljensku reakciju. To praktično znači da agensi koji izazivaju nekrotičnu ćelijsku smrt dovode i do sledstvene inflamacije, a to je, gledano sa stanovišta terapije malignih tumora, poželjan efekat.

Smisao ispitivanja bioloških efekata fulerena je potencijalna upotreba u terapiji humanih oboljenja. Za sada je najpodrobnije ispitana sposobnost fulerena kao fotosenzitizera za fotodinamičko uništavanje ćelija tumora. Glavna prednost ovakvog terapeutskog pristupa bi bila selektivnost jer se aktivacija agensa osetljivog na svetlost vrši precizno fokusiranim svetlosnim zrakom uperenim na tumor, kada je na površini kože, ili korišćenjem optičkog vlakna za unutrašnje tumore (Brown, Brown i sar., 2004). Efikasnost fotodinamičke terapije različitim derivatima  $C_{60}$  rastvorljivim u vodi.

je pokazana na više tipova ćelijskih linija tumora (pluća, debelog creva, grlića materice, larinksa) (Mroz, Tegos i sar., 2007). Sa druge strane, do sada je pokazano da C<sub>60</sub> nanočestice rastvorene uz pomoć polimera polivinilpirolidona (PVP) i polietilen glikola (PEG) ili oligosaharida  $\gamma$ -ciklodekstrina, smanjuju nivo unutarćelijskih RKV i RKV produkciju u eksperimentalnim sistemima bez ćelija (Xiao, Takada i sar., 2005; Takada, Kokubo i sar., 2006). Na humanim keratinocitima je potvrđen citoprotektivni efekat (PVP)/C<sub>60</sub> na modelu ćelijske smrti izazvane UV zračenjem (Xiao, Takada i sar., 2006). Takođe, postoji mnogo podataka o antioksidativnim i citoprotektivnim efektima fullerola i karboksifulerena (Monti, Moretti i sar., 2000; Ali, Hardt i sar., 2004). Antioksidativno, citoprotektivno dejstvo nederivatizovanih nC<sub>60</sub> nije dovoljno ispitano, kao ni njihova potencijalna upotreba u terapiji, te je ova disertacija pokušaj da se ti fenomeni dodatno istraže.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ova doktorska disertacija ima sledeće ciljeve:

- Ispitati kako različiti načini pripreme nC<sub>60</sub> (izmena rastvarača, oblaganje surfaktantima) utiču na sposobnost fullerenskih nanočestica da indukuju, odnosno spreče oksidativni stres i ćelijsku smrt.
- Utvrditi biološke i fizičko-hemijske mehanizme odgovorne za prooksidativno i citotoksično dejstvo nC<sub>60</sub> pripremljenih različitim metodama.
- Utvrditi biološke i fizičko-hemijske mehanizme odgovorne za antioksidativno i citoprotektivno dejstvo nC<sub>60</sub> pripremljenih različitim metodama.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1.Ćelije i ćelijske kulture

Dejstvo fullerenskih nanočestica je ispitivano na humanim keratinocitima NTCC 2544 i normalnim dermalnim fibroblastima NHDF, pacovskoj ćelijskoj liniji glioma C6, i mišijim ćelijskim linijama fibrosarkoma L929 i melanoma B16. Ćelijska linija pacovskog astrocitoma C6 (ATCC CCL-107) dobijena je ljubaznošću dr Pedra Tranque (Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Španija). Ćelije mišijeg fibrosarkoma L929 su nabavljene od Evropske kolekcije ćelijskih kultura (*European Collection of Cell Cultures*, Salisbury, UK), dok su ćelije mišjeg melanoma B16 dobijene od dr Siniše Radulovića (Institut za Onkologiju i Radiologiju, Beograd, Srbija). Ćelije su gajene u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>, na temperaturi od 37°C, u HEPES-om (20 mM) puferizovanom medijumu RPMI 1640 sa 5% fetalnog goveđeg seruma, 2 mM L-glutamina i 100 IU/ml penicilina i streptomicina (sve od PAA, Pasching, Austrija). Ćelijske linije su po odmrzavanju iz tečnog azota propagirane u plastičnim bocama za kultivaciju ćelija od 25 cm<sup>3</sup>. Po dostizanju konfluentnosti, ćelije su odlepljivane tripsinom (PAA) i korišćene u eksperimentima. U cilju ispitivanja vijabiliteta, ćelije su zasejavane u ploče sa 96 bunara (1 x 10<sup>4</sup> ćelija po bunaru) ili u ploče od 6 bunara (5 x 10<sup>5</sup> ćelija po bunaru). Za analize na protočnom citometru ćelije su zasejavane u ploče sa 24 bunara (1 x 10<sup>5</sup> ćelija po bunaru). Ploče za kultivaciju ćelija su nabavljene od kompanije Sarstedt (Nümbrecht, Nemačka). Sve ćelije su tretirane 24 sata nakon zasejavanja.



## 3.2. Priprema i karakterizacija fullerenskih nanočestica

### 3.2.1 Priprema nanočestica metodom zamene rastvarača i mehanohemijском metodom

Fulereni su sintetisani u elektrolučnom reaktoru i ekstrahovani u Soxlet ekstraktoru korišćenjem toluena kao rastvarača. Ekstrakt je bio mešavina fulerena građena od 80% fulerena C<sub>60</sub> i 20% fulerena C<sub>70</sub>. Upotrebom metode zamene rastvarača, u skladu sa prethodno objavljenom procedurom (Fortner, Lyon i sar., 2005) pripremljeni su THF/nC<sub>60</sub> i EtOH/nC<sub>60</sub> korišćenjem THF i etanola kao rastvarača. Ukratko, fulereni u prahu su raspršeni u svežem THF-u HPLC čistoće (Carlo Erba, Milano, Italija) ili u destilovanom etanolu u koncentracijama od 25 ili 11 mg/l. Nakon što je smeša prečišćena argonom da bi se uklonili ostaci rastvorenog kiseonika, dodate su jednake količine MiliQ vode u THF/nC<sub>60</sub> i EtOH/nC<sub>60</sub> filtrate brzinom od 2 l/min, uz neprekidno mešanje. THF i etanol su zatim uklonjeni iz rastvora korišćenjem rotacionog uparivača na temperaturama od 45°C za THF i 68°C za etanol. H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> je pripremljen produženim mešanjem 200 mg fulerena u prahu u 500 ml vode, korišćenjem magnetne mešalice na 500 rpm u trajanju od 4 nedelje (Cheng, Kan i sar., 2004). Fullerenski rastvori su filtrirani kroz najlonski filter od 0,45 μm, a koncentracije su određivane apsorpcionom procedurom. Koncentracija THF/nC<sub>60</sub> je bila 12 μg/ml, EtOH/nC<sub>60</sub> 6 μg/ml, a H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> 2,1 μg/ml. Zračenje THF/nC<sub>60</sub> je izvršeno na sobnoj temperaturi u prostorijama sa Cobalt-60 izvorom Instituta za nuklerane nauke Vinča (Beograd, Srbija). Uzorak THF/nC<sub>60</sub> je smešten najbliže moguće izvoru zračenja u trajanju od 3 sata, sa stopom zračenja od 11,3 kGy/h. γ-ozračeni THF/nC<sub>60</sub> je imao sličnu boju ali je bio blago viskoziji od THF/nC<sub>60</sub>. Za pripremu mehanohemijski sintetisanih fullerenskih nanočestica, mehanohemijaska aktivacija je izvedena u KHD Humboldt Wedag AG vibracionom mlinu koji je rekonstruisan za meku mehaničku sintezu. Stopa vibracije mlina je 10000 vibracija po minuti, dok je energija udara podešena tako da bude dovoljna da pretvori fullerenski prah u nanočestice bez oštećenja strukture fulerena C<sub>60</sub>. U prvoj fazi je mleveno 20 mg C<sub>60</sub> (99,9%; Bucky USA, Hjuston, Teksas) u trajanju od 15 minuta sa polovinom od totalne mase (2,5 mg) natrijum dodecil sulfata (SDS), γ-

ciklodekstrina (CDX) (oba od Sigma, St Louis, SAD) ili etilen-vinil acetat-etilen vinil versatata (EVA-EVV dobijenog ljubaznošću Celanese GMBH, Frankfurt, Nemačka). Nakon toga, mala količina mešavine etanola i dejonizovane vode je dodata da bi se održala homogenizacija i oblaganje fulerena tankim slojem SDS/CDX/EVA-EVV. Svaka mešavina je zatim dodatno mlevena 15 minuta. Ostatak svakog solubilizacionog agensa dodat je u 4 jednaka dela, uz 7 minuta duge periode mlevenja izmađu. Nakon poslednjeg mlevenja, uzorci su rastvoreni u dejonizovanoj vodi, filtrirani kroz filter od 0,45  $\mu\text{m}$  i koncentracija im je svedena na 1  $\mu\text{g/ml}$ . Kontrolni uzorci, sa agensom za rastvaranje a bez  $\text{C}_{60}$ , su pripremljeni istom procedurom. Dobijeni rastvori su bili stabilni 3 meseca, na temperaturi od 4°C i nisu pokazivali znakove taloženja.

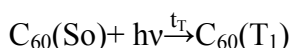
### ***3.2.2 Karakterizacija fulerenskih nanočestica***

UV-vidljivi spektri rastvora  $\text{nC}_{60}$  su skenirani u opsegu od 200-550 nm korišćenjem Contron UV-vis spektrofotometra. Sva UV-vis merenja su sprovedena na 21°C i bila su automatski korigovana u odnosu na medijum u kom su merenja izvedena (voda). Podaci o distribuciji veličine čestica u različitim rastvorima  $\text{C}_{60}$  su dobijeni korišćenjem Brookhaven Instruments sistema za rasejanje svetlosti, opremljenih sa BI-200SM goniometrom, BI-9000 AT korelatorom, kontrolorom temperature i Coherent INNOVA 70°C argon-jonskim laserom. Dinamičko-svetlosno rasejanje (DLS) je tehnika za merenje veličine i rasporeda veličine molekula i čestica manjih od 1  $\mu\text{m}$ . Ova merenja su izvršena korišćenjem lasera snage 135 mW sa ekscitacijom na 514,5 nm pri detekcionom uglu od 90°, a normalizovana distribucija veličina čestica je izračunata korišćenjem Brookhaven Instruments softvera za određivanje veličine čestica. Mikroskop atomskih sila (engl. Atomic Force Microscope, AFM) ili skenirajući mikroskop sila je uređaj koji pripada porodici mikroskopa sa skenirajućom sondom čiji se rad zasniva na merenju međumolekularnih sila koje deluju između atoma merne sonde i atoma ispitivanog uzorka. AFM merenja su izvršena Quesant (Santa Cruz, CA) mikroskopom. Čestice su raširene na silikatnom supstratu i slikane nakon sušenja. Korišćeni su standardni silikonski vrhovi (Nano and More, Wetzlar, Nemačka) sa konstantnom silom od 40 N/m.

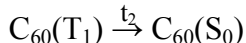
### 3.2.3 Matematičko modelovanje produkcije singlet kiseonika od strane $nC_{60}$

Da bi se opisao proces u kojem fullerenski nanokristali proizvode singlet kiseonik, razvijen je jednostavan kinetički model baziran na modelu za fullerenske rastvore (Belousova, Mironova i sar., 2005). Pretpostavlja se da fulereni rastvoreni u organskim rastvaračima, po dodavanju vode u rastvor, formiraju nanokristale i da određena količina organskog rastvarača ostaje ugrađena u slojevima strukture kristala (Fortner, Lyon i sar., 2005). To znači da u građu fullerenskog nanokristala ulazi fuleren, sa sposobnošću da proizvede singlet kiseonik, i organski rastvarač koji anulira odnosno kvenčuje singlet kiseonik. U modelu se pretpostavlja difuzija kiseonika u triplet stanju iz vode (ili ćelijskog medijuma) u unutrašnjost nanokristala. Sledi set reakcija:

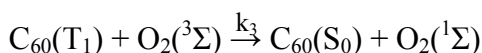
(1) Apsorpcija svetlosti od strane fulerena i tranzicija iz singlet u triplet stanje



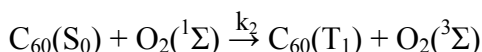
(2) Degradacija triplet stanja fulerena



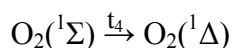
(3) Nastanak  $\Sigma$  kiseonika



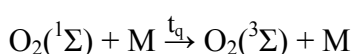
(4) Kvenčovanje singlet  $\Sigma$  kiseonika od strane fulerena u osnovnom stanju



(5) Prelaz između  $^1\Sigma$  i  $^1\Delta$  stanja u molekulu kiseonika



(6) Kvenčovanje singlet kiseonika od strane molekula M (voda, etanol i THF) ugrađenih u fullerenski nanokristal



Uzet je u obzir standardan režim zračenja sa intenzitetom  $I=20\text{mW/cm}^2$  koji odgovara ambijentalnom svetlu u laboratoriji. Efektivno vreme ekscitacije triplet stanja  $t_r=4.17\text{s}$ .

Vreme trajanja  $t_2$  triplet stanja fullerena  $C_{60}$  je  $143 \mu s$  (Ausman i Weisman, 1997). Vreme trajanja  $^1\Sigma$  kiseonika u rastvorima je  $t_4 \sim 10^{-10}s$  (Snelling, 1968). Konstante  $k_2$  i  $k_3$  imaju vrednosti  $1 \times 10^{-15} \text{ cm}^3/s$  i  $3.3 \times 10^{-12} \text{ cm}^3/s$  (Arbogast, Darmanyan i sar., 1991). Karakteristično vreme trajanja  $t_q$  singlet kiseonika u vodi, etanolu i THF-u su 4.1, 13 i 480 ms, odgovarajućim redosledom (Studer, Brewer i sar., 1989; Näther, Gilchrist i sar., 1993). Sistem kinetičkih jednačina je osnova ovog modela:

$$\frac{dN_1}{dt} = -\frac{N_1}{t_T} + \frac{N_2}{t_2} + k_3 N_2 N_3 - k_2 N_1 N_4$$

$$\frac{dN_2}{dt} = \frac{N_1}{t_T} - \frac{N_2}{t_2} - k_3 N_2 N_3 + k_2 N_1 N_4$$

$$\frac{dN_3}{dt} = -k_3 N_2 N_3 + \frac{N_5}{t_q} + k_2 N_1 N_4$$

$$\frac{dN_4}{dt} = k_3 N_2 N_3 - \frac{N_4}{t_4} - k_2 N_1 N_4$$

$$\frac{dN_5}{dt} = \frac{N_4}{t_4} - \frac{N_5}{t_q}$$

Količine  $N_1$ - $N_5$  su koncentracije u  $\text{cm}^{-3}$ :  $C_{60}(S_0)$ ,  $C_{60}(T_1)$ ,  $O_2(^3\Sigma)$ ,  $O_2(^1\Sigma)$  i  $O_2(^1\Delta)$ , tim redosledom. Početni uslovi za jednačinu (7) su dati:

$$N_1(0) = N_F = 10^{21} \text{ cm}^{-3}; N_3(0) = N_{O_2} = 10^{13} \text{ cm}^{-3}$$

$$N_2(0) = N_4(0) = N_5(0) = 0$$

Koncentracija kiseonika u vodi, pri atmosferskom pritisku i sobnoj temperaturi je reda veličine  $10^{17} \text{ cm}^{-3}$  (Battino, Rettich i sar., 1983). Naša pretpostavka, za ovaj model, je bila da je koncentracija kiseonika u osnovnom stanju  $N_{O_2} = 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ , u unutrašnjosti kristala, i to zbog otežane difuzije kiseonika iz vode (ili ćelijskog medijuma) u prostore u kristalnoj strukturi nanokristala.

### 3.3. Rastvori i reagensi

U eksperimentima čiji rezultati su korišćeni u izradi ove doktorske teze korišćeni su sledeći reagensi: serum fetusa govečeta (*engl.* fetal calf serum, FCS), medijum za kultivaciju ćelija- RPMI-1640 (*engl.* Roswell Park Memorial Institute Medium), rastvor antibiotika i antimikotika (PAA, Linz, Austrija), tripsin (Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), dimetilsulfoksid (DMSO; Sigma-Aldrich), MTT (3-4,5dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid; Sigma-Aldrich), kristal violet, aneksin V-FITC (BD Pharmingen, San Diego, SAD), propidijum jodid (PI; BD Pharmingen, San Diego, SAD), ApoStat (R&D Systems, Minneapolis, SAD), dihidroetidijum (DHE; Invitrogen, Paisley, UK), dihidrorodamin (DHR; Invitrogen, Paisley, UK), 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat (DCFDA (Invitrogen, Paisley, UK), rastvori preparata fullerenskih nanočestica: THF/nC<sub>60</sub>, EtOH/nC<sub>60</sub>, H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub>, SDSnC<sub>60</sub>, CDXnC<sub>60</sub> i EVA-EVVnC<sub>60</sub>. Zatim antioksidativni agensi: N-acetilcistein (NAC), triptofan (Tpf) i natrijum-azid (NaN<sub>2</sub>) (svi od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), prooksidativni agensi: vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i gvožđe-sulfat (FeSO<sub>4</sub>) (oba iz Zorke, Šabac, Srbija), NO-donori: natrijum nitroprusid (SNP; Sigma-Aldrich), S-nitrozo-N acetilpenicilamin (SNAP; Sigma-Aldrich), S-nitrozoglutation (GSNO; Sigma-Aldrich) i morfolino-sidonimin (SIN-1; Sigma-Aldrich), malondialdehid-bis (dimetilacetal)1,1,3,3-tetrametoksipropan (MDA; Sigma-Aldrich), trihlor sirćetna kiselina (TCA; Sigma-Aldrich) i tiobarbituratna kiselina (TBA; Sigma-Aldrich), natrijum nitrit (NaNO<sub>2</sub>; Sigma-Aldrich). Vreme inkubacije i koncentracije navedenih agenasa su napomenuti na slikama ili legendama slika.

### 3.4. Testovi vijabiliteta

Uticaj fullerenskih nanočestica na vijabilitet ćelija je određivan kolorimetrijskim metodama zasnovanim na merenju aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze, laktat dehidrogenaze i određivanjem adherentnosti ćelija kristal violet testom.

### **3.4.1. MTT test**

MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid) test je zasnovan na redukciji tetrazolijumske soli MTT dehidrogenazama ćelijskih mitohondrija. Pri ovome dolazi do cepanja tetrazolijumskog prstena i pojave formazana, koji poseduje karakterističnu boju. MTT mogu da redukuju samo aktivne mitohondrije živih ćelija te je ovaj kolorimetrijski test pogodan za merenje broja vijabilnih ćelija, njihove aktivnosti i proliferacije. Nakon završetka kultivacije i uklanjanja medijuma u bunare je nalivano po 50  $\mu$ l rastvora MTT (0,5 mg/ml), da bi potom bila nastavljena inkubacija u periodu od 1 sata. Supernatanti su zatim odlivani, a ćelije lizirane DMSO-om. Ova tečnost je ujedno služila i za rastvaranje nagrađenog formazana, tako da se u bunarima razvijala karakteristična crveno-ljubičasta boja, čiji je intenzitet određivan na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča, pri talasnoj dužini svetlosti od 570 nm (Sunrise; Tecan, Dorset, Velika Britanija). Intenzitet razvijene boje i odgovarajuća vrednost absorbancije proporcionalno su odgovarali broju živih ćelija.

### **3.4.2. Kristal violet test**

Kristal violet test omogućava određivanje relativnog broja adherentnih ćelija (Flick i Gifford, 1984). Nakon odgovarajućeg tretmana kulture su tri puta ispirane PBS-om da bi se odstranile neadherentne ćelije. Usledila je fiksacija adherentnih ćelija metanolom 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom i bojenje fiksiranih ćelija rastvorom kristal violeta (1 %) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, bunari su intenzivno ispirani vodom da bi se odstranila boja koju nisu primile fiksirane ćelije. Boja ugrađena u ćelije rastvarana je u 33 % rastvoru sirćetne kiseline, a intenzitet oslobođene boje određivan je merenjem absorbancije svetlosti od 570 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju. Izmerene absorbancije odgovarale su broju adherentnih ćelija. Rezultati MTT i kristal violet testa su predstavljeni kao % vijabilneta u odnosu na kontrolne (netretirane) kulture čiji je vijabilitet arbitrarno postavljen na 100%.

### 3.4.3. LDH test

Ćelijska smrt praćena gubitkom integriteta ćelijske membrane analizirana je primenom testa koji meri aktivnost citosolnog enzima laktat dehidrogenaze (LDH), koji se nakon oštećenja ćelijske membrane oslobađa u supernatant (Raicevic, Mladenovic i sar., 2005). Za potrebe testa je bilo neophodno, pored kontrole netretiranih ćelija (žive ćelije), obezbediti i pozitivnu kontrolu (100 % mrtve ćelije). Nju su činile ćelije lizirane deterđžentom Triton X-100 (3%), koje usled potpunog narušavanja integriteta ćelijske membrane maksimalno oslobađaju citosolnu LDH. Princip LDH testa se zasniva na dve oksido-redukcije. U prvoj se laktat oksiduje u piruvat, pri čemu se  $\text{NAD}^+$  redukuje u  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . U narednoj reakciji fenazin-metosulfat posreduje u reoksidaciji  $\text{NADH} + \text{H}^+$  u  $\text{NAD}^+$ , pri čemu se tetrazolijum hlorid redukuje u obojeni formazan. Protokol ovog testa podrazumeva dodavanje 100  $\mu\text{l}$  supstrata za LDH na 100  $\mu\text{l}$  supernatanta uzetog iz bunarića sa tretiranim ćelijama. Za pripremu supstrata za LDH korišćen je 54 mM L(+) laktat, 0,66 mM tetrazolijum hlorid, 0,28 mM fenazin-metosulfat i 1,3 mM  $\text{NAD}^+$  (sve od Sigma-Aldrich), koji su rastvoreni u 0,2 M Tris-puferu pH 8,2. Po isteku 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi, apsorbance su merene na talasnoj dužini od 492 nm sa korekcijom na 592 nm, na čitaću za mikrotitarske ploče. Rezultati su predstavljeni u procentima citotoksičnosti u odnosu na ćelije lizirane sa Triton X-100 (pozitivna kontrola, 100% mrtve ćelije) koja je izračunata pomoću prikazane formule:

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

E – apsorbance tretiranih ćelija

S – apsorbance kontrolnih (netretiranih) ćelija

M – apsorbance mrtvih ćelija dobijenih liziranjem sa Triton X-100

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

### 3.5. Analiza parametara ćelijske smrti

Parametri ćelijske smrti su analizirani metodom protočne citometrije na aparatu FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka). Svaka analiza je obuhvatila 10000 događaja tj. ćelija po pojedinačnom uzorku, za tretmane koji su rađeni u duplikatu ili triplikatu. Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem kompjuterskog programa BD Cell Quest Pro. Za utvrđivanje stepena lipidne peroksidacije je korišćen kolorimetrijski test za malondialdehid.

#### 3.5.1. Određivanje apoptoze i nekroze

Da bi se utvrdio udeo apoptotičnih i nekrotičnih ćelija u kulturi nakon odgovarajućih tretmana, ćelije su bojene aneksin V-fluorescein-izotiocijanatom (aneksin V-FITC) i propidijum jodidom (PI), a zatim analizirane na protočnom citometru. Aneksin V-FITC je protein mase 35-36 kDa obeležen fluorescein izotiocijanatom (FITC) koji nakon pobuđivanja svetlošću argonskog lasera FACSCalibur aparata (talasna dužina 488 nm) emituje zelenu fluorescencu (FL1). Aneksin V ima veliki afinitet za vezivanje za fosfatidil-serin koji se nalazi u spoljašnjem delu fosfolipidnog dvosloja ćelijske membrane ćelija u apoptozi. PI je fluorescentna boja koja se umeće između nukleobaza dvolančane DNK i po pobuđivanju laserskom svetlošću protočnog citometra emituje crvenu fluorescencu (FL2) koja je proporcionalna sadržaju DNK u ćeliji. PI ne može da prođe kroz očuvanu ćelijsku membranu, ali prolazi kroz oštećenu membranu nekrotičnih ćelija i vezuje se za DNK. Dvostrukim bojenjem sa aneksin V-FITC i PI se mogu razlikovati populacije ćelija koje se na tačkastom dijagramu prikazuju u kvadratnoj raspodeli kao: zdrave (aneksin<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), apoptotične (aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) i nekrotične ćelije (aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Bojenje ćelija je sprovedeno prema instrukcijama proizvođača (BD Pharmingen, San Diego, SAD). Po isteku inkubacije, ćelije iz ploče sa 24 bunara su tripsinizirane i prebacivane u odgovarajuće FACS epruvete. Nakon centrifugiranja (500 g, 5 min) i pranja (1 ml PBS), talog ćelija je resuspendovan u  $10^6$  razblaženog originalnog pufera (aneksin-vezujući pufer) u koji je dodato 10  $\mu$ l PI i 0,2



μl aneksin V-FITC. Po završetku inkubacije (30 minuta, 37°C), u svaku epruvetu je dodato po 400 μl razblaženog pufera. Svaki uzorak je zatim analiziran na protočnom citometru. Rezultati su izraženi kao udeo odgovarajućih ćelijskih populacija u ukupnom broju analiziranih ćelija.

### ***3.5.2. Određivanje fragmentacije DNK***

Fragmentacija DNK je ispitivana protočnom citometrijom, nakon fiksacije ćelija u etanolu i bojenja propidijum jodidom, po prethodno opisanom protokolu (Raicevic, Mladenovic i sar., 2005). Ova metoda omogućava razlikovanje faza ćelijskog ciklusa, a može se koristiti i za određivanje broja ćelija sa hipodiploidnim sadržajem DNK, odnosno fragmentisanom DNK kao parametrom apoptoze. Ukratko, po isteku tretmana ćelije su tripsinizirane, 2 puta oprane u 1 ml PBS i resuspendovane u 300 μl PBS i 700 μl hladnog apsolutnog etanola. Sadržaj svake epruvete je zatim pažljivo resuspendovan, a epruvete ostavljene na +4°C preko noći. Zatim su ćelije centrifugirane (800 g, 5 minuta, 22°C), oprane u PBS-u, a talog ćelija je resuspendovan u 300 μl PBS uz dodatak 0,1% Triton X-100 i 1 mg/ml RNA-ze (Sigma-Aldrich). Po isteku 15 minuta inkubacije na 37°C, u svaku epruvetu je dodavano 0,05 mg/ml PI. Nakon 30 minuta inkubacije na 37°C, usledila je analiza na protočnom citometru. Ćelije sa hipodiploidnim sadržajem se na histogramu distribucije intenziteta FL2 fluorescence vide u sub-G<sub>0</sub> segmentu. Rezultati su izraženi kao % ćelija u sub-G<sub>0</sub> fazi u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

### ***3.5.3. Određivanje aktivacije kaspaza***

Aktivacija kaspaza, enzima odgovornih za pokretanje i izvršavanje apoptotskog mehanizma ćelijske smrti, ispitivana je na protočnom citofluorimetru nakon bojenja ćelija fluorescentno obeleženim pankaspaznim inhibitorom, koji se specifično vezuje za aktivirane kaspaze, prema instrukcijama proizvođača (ApoStat; R&D Systems,

Minneapolis, SAD) ili selektivni reagensi na kaspazu-3 i kaspazu-8 (Vybrant Caspase, Invitrogen). Ukratko, nakon odgovarajućih tretmana ćelije su tripsinizirane, centrifugirane (500 g, 5 minuta, 22°C) i oprane u PBS-u. Zatim je talog ćelija resuspendovan u 300 µl medijuma koji je sadržavao 3 µl fluorescentno obelježenog (FITC) pan-kaspaznog inhibitora (finalna koncentracija 0.5 µg/ml). Po isteku 30 minuta inkubacije na 37°C, ćelije su oprane i resuspendovane u 500 µl PBS i analizirane na protočnom citometru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta FL1 fluorescence i prikazani su kao % ćelija u kojima su aktivirane kaspaze

#### ***3.5.4. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije***

Lipidna peroksidacija je dobro definisan mehanizam ćelijskog oštećenja. Lipidni peroksidi su nestabilni indikatori oksidativnog stresa kod ćelija, koji se raspadaju i formiraju kompleksnije i reaktivnije molekule kao što je malondialdehid-bis-(dimetilacetal)1,1,3,3-tetrametoksipropan (MDA). Merenje krajnjih produkata lipidne peroksidacije predstavlja veoma prihvaćen test za merenje oksidativnog oštećenja ćelije. Vezivanje tiobarbituratne kiseline za MDA dovodi do nastanka hromogenog kompleksa. Liziranjem  $5 \times 10^6$  tretiranih ćelija sa ledenim 10% TCA dobijeni su lizati koji su centrifugirani na 800 g u trajanju od 10 minuta. Alikvotima (1 ml) supernatanta je dodato po 1 ml 0,6% 2-tiobarbituratne kiseline i smeša je zagrevana 10 minuta u vodenom kupatilu na 100°C. Uzorci su ohlađeni i boja je očitavana na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča na talasnoj dužini od 535 nm. Koncentracija MDA je određena poređenjem sa standardnom krivom.

#### ***3.5.5. Određivanje nivoa depolarizacije mitohondrija***

Mitohondrijalni membranski potencijal je ispitivan korišćenjem boje DePsipher (R&D Systems, Minneapolis, SAD), lipofilnog katjona koji ima sposobnost da stvara agregate nakon polarizacije mitohondrijalne membrane, formirajući narandžasto-crvenu

fluorescentnu supstancu. Ako je došlo do poremećaja potencijala mitohondrijalne membrane, boja ne može da prodre u prostor između membrana i ne može da agregira ili se vraća u svoju monomernu formu zelene boje. Čelije su posle tretmana tripsinizirane i centrifugirane na 500 g u trajanju od 5 minuta. Vršiti se inkubacija ćelija na 37°C u trajanju od 20 minuta sa finalnom koncentracijom boje od 5 µg/ml. Čelije se zatim ispiraju PBS-om i resuspenduju u 500 µl PBS-a. Intenzitet zelene boje monomera i crvene boje agregata analiziran je protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao odnos crvene i zelene fluorescence (FL2/FL1), relativno u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije. Porast ove vrednosti ukazuje na mitohondrijalnu hiperpolarizaciju, a smanjenje na depolarizaciju.

### **3.6. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta**

#### ***3.6.1. Određivanje produkcije RKV u uslovima sa ćelijama***

Da bi se odredila ukupna produkcija RKV ćelije su bojene neselektivnim redoks senzitivnim bojama dihidrorodamin 123 (DHR) (Invitrogen) i 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA) (Invitrogen) dok je za detekciju produkcije superoksidnog anjona korišćena fluorescentna boja dihidroetidijumom (DHE; Sigma-Aldrich), a za detekciju azot monoksida i peroksinitrita diaminofluorescein (DAF; Sigma-Aldrich). Čelije su bojene prema instrukcijama proizvođača. Ukratko, DHR i H<sub>2</sub>DCFDA su dodavani u ćelijsku kulturu na početku tretmana i to u finalnoj koncentraciji od 2 µM, dok su DHE i DAF po isteku tretmana dodavani u finalnoj koncentraciji od 20 µM i inkubirani 30 minuta na 37°C. Nakon toga, ćelije su tripsinizirane, prebačene u odgovarajuće epruvete i centrifugirane (500 g, 5 minuta, 22 °C), a zatim oprane sa 1 ml PBS. Čelije su finalno resuspendovane u 500 µl PBS i analizirane na protočnom citometru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta fluorescence (FL1 za DHR, H<sub>2</sub>DCFDA i DAF bojenja, a FL2 za DHE bojenje), pri čemu pomeraj histograma tretiranih ćelija udesno u odnosu na kontrolu ukazuje na povećanje produkcije RKV, RAV, odnosno superoksidnog anjona

### **3.6.2. Određivanje produkcije RKV i RAV u vodenom rastvoru**

DHR i DAF su korišćeni i za merenje RKV i RAV u rastvoru bez ćelija, korišćenjem Chameleon (Hidex, Turku, Finska) fluorescentnog čitača pri ekscitaciji od 488 nm i detekciji na 535 nm. Pripremane su mešavine određenih koncentracija fulerenskih preparata, NO donora i fluorescentnih boja i praćena je dozna i vremenska zavisnost promena u koncentraciji RKV i RAV. Koncentracija nitrita kao odraz produkcije NO je odredjivana u supernatantima ćelijskih kultura Griess-ovom metodom (Green i saradnici, 1982). Iz tretiranih ćelijskih kultura su skupljani supernatanti nakon odgovarajućeg perioda inkubacije (24 do 48 časova), a zatim je po 50  $\mu$ l supernatanta mešano sa istovetnom zapreminom Griess-ovog reagensa u pločama sa 96 bunarčića sa ravnim dnom. Posle inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi, odredjivana je absorbancija svetlosti talasne dužine 570 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Koncentracija nitrita odredjivana je na osnovu standardne krive dobijene odredjivanjem absorbancija za poznate koncentracije  $\text{NaNO}_2$ . Elektron-paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija je korišćena za praćenje produkcije singlet kiseonika u vodenom rastvoru. Metoda se zasniva na sposobnosti tetrametilpiperidina (TMP), diamagnetika rastvorljivog u vodi, da veže singlet kiseonik i pritom generiše paramagnetni proizvod, stabilni nitroksid radikal TEMPOL (Lion, Delmelle i sar., 1976; Bertrand, Małgorzata i sar., 2005). Nesporeni elektron se nalazi na NO grupi TEMPOL radikala, što dovodi do hiperfinog cepanja EPR signala na tri uske linije usled interakcije između nesporenog elektronskog spina i jezgra azota  $^{14}\text{N}$ . EPR eksperimenti su izvršeni na sobnoj temperaturi, na Varian E-line spektrometru. Mešavina koja sadrži 0,18 mM TMP (Sigma-Aldrich) i različite  $\text{nC}_{60}$  koloide (koncentracije 2 mg/ml) je ultrasonifikovana i inkubirana 24 h na sobnoj temperaturi. Po 7 ml mešavine TMP- $\text{nC}_{60}$  prebaćeni su u kvarcne kivete i EPR-om je analiziran TEMPOL signal. Kvantifikacija signala je postignuta izraćunavanjem srednjih vrednosti amplituda EPR signala, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti.

### **3.7. Ispitivanje morfologije ćelija u kulturi**

Morfologija različitih ćelijskih kultura je analizirana primenom invertne svetlosne mikroskopije i Kodak MDS 100 digitalne kamere za svetlosni mikroskop.

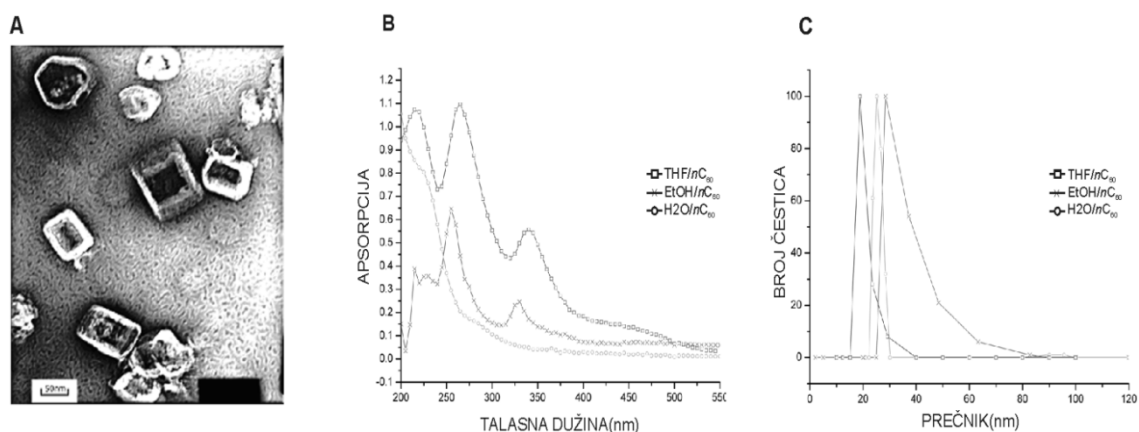
### **3.8. Statistička analiza**

U statističkoj obradi podataka korišćene su metode analitičke statistike. Za procenu značajnosti razlike između dva nezavisna uzorka korišćen je Studentov t-test, a za analizu statističke značajnosti razlike između više nezavisnih uzoraka korišćena je analiza varijanse (ANOVA), praćena Student-Newman-Keuls-ovim testom za višestruka poredjenja. Vrednost  $p < 0,05$  je smatrana statistički značajnom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Karakterizacija koloida nC<sub>60</sub>

Da bi se ispitali biološki efekti fulerena i da bi se omogućila njihova potencijalna primena razvijene su i usavršavane različite metode za njihovo rastvaranje u vodi. Nakon pripreme fulerenskih preparata metodom izmene rastvarača, opisanom u poglavlju Materijal i Metode, ispitivane su njihove fizičko-hemijske karakteristike. Slike dobijene transmissionom elektronskom mikroskopijom su pokazale da C<sub>60</sub> u vodi formira agregate u obliku nanokristala (Slika 3A). UV apsorpcioni spektri THF/nC<sub>60</sub> i EtOH/nC<sub>60</sub> su bili tipični za C<sub>60</sub>, mada se javio blagi pomeraž u poziciji vrhova (Slika 3B). Sa druge strane, H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> nije pokazao tipične odlike apsorpcionog spektra C<sub>60</sub>. On je, kao i druga dva koloida, pokazao visoke vrednosti apsorpcije u dubokom UV regionu, ali su se u ovom slučaju karakteristični C<sub>60</sub> pikovi jedva primećivali (Slika 3B). Razlog za to može da bude značajno niža koncentracija C<sub>60</sub> u H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> preparatu (2,1 µg/ml) u poređenju sa THF/nC<sub>60</sub> sa 12 µg/ml ili EtOH/nC<sub>60</sub> sa 6 µg/ml. DLS metodom je utvrđeno da je prosečna veličina čestica u THF/nC<sub>60</sub> preparatu 20,5 nm, u EtOH/nC<sub>60</sub> 29,2 nm i u H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> preparatu 35,1 nm (Slika 3C).

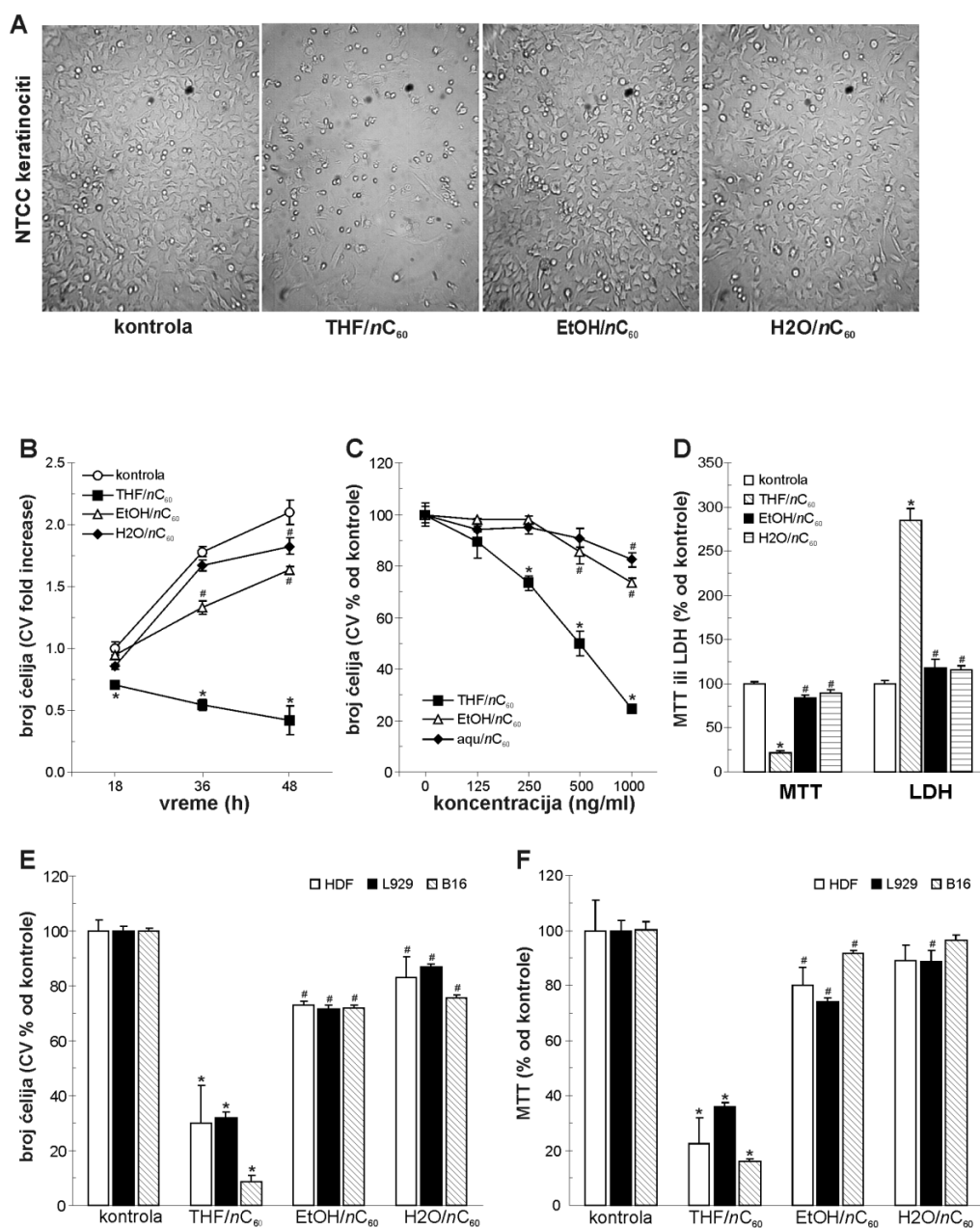


**Slika 3. Karakterizacija fulerenskih koloida:** (A) Fotografije nC<sub>60</sub> kristala dobijene transmissionom elektronskom mikroskopijom. (B) UV-vis spektar apsorbance različitih nC<sub>60</sub> koloida. (C) Normalizovana distribucija veličinačestica različitih nC<sub>60</sub> koloida.

Mali procenat čestica u H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> preparatu, oko 1%, su imale prečnik od 92 nm, dok su čestice EtOH/nC<sub>60</sub> pokazale mnogo širi spektar veličina u odnosu na druga dva preparata.

#### **4.2. Citotoksičnost nC<sub>60</sub> zavisi od rastvarača koji se koristi za njihovu pripremu**

Pošto su utvrđene fizičko-hemijske karakteristike fullerenskih koloida, dalje je ispitivano da li vrsta rastvarača utiče na biološke efekte koloida. Prvi korak je bio ispitivanje toksičnosti pripremljenih fullerenskih preparata, odnosno njihov uticaj na vijabilitet različitih primarnih i tumorskih ćelijskih linija. Ćelije NTCC 2544 humanih keratinocita su tretirane različitim preparatima nC<sub>60</sub> u koncentraciji od 1 µg/ml u trajanju od 48 h. Morfološka analiza invertnom mikroskopijom pokazala je da je samo THF/nC<sub>60</sub> izazvao značajne morfološke promene na NTCC ćelijama. Ćelije su se smanjile, zaokruglile i odlepile od podloge što je u skladu sa indukcijom ćelijske smrti (Slika 4A). Sa druge strane, većina ćelija tretiranih sa EtOH/nC<sub>60</sub> ili H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> je zadržale poligonalnu ili vretenastu formu karakterističnu za kontrolne, netretirane ćelije (Slika 4A). U skladu sa podacima dobijenim svetlosnom mikroskopijom i analiza tretiranih ćelija kristal violetom, koji bojenjem adherentnih ćelija određuje broj živih ćelija, pokazala je da THF/nC<sub>60</sub> dovodi do značajnog dozno i vremenski zavisnog smanjenja broja ćelija, dok su EtOH/nC<sub>60</sub> i H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> pokazali blagu citotoksičnost (Slika 4B i 4C). Slični rezultati su dobijeni i merenjem vijabiliteta MTT testom koji detektuje aktivnost mitohondrija (Slika 4D). Takođe, LDH test je pokazao da THF/nC<sub>60</sub> dovodi do značajnog oštećenja ćelijske membrane, dok su dva druga koloida indukovala samo blagu citotoksičnost (Slika 4D). Konačno, pošto su MTT i kristal violet testovi pokazali da je THF/nC<sub>60</sub> toksičan za humane fibroblaste NHDF, kao i za mišji fibrosarkom L929 i mišji melanom B16, dok su EtOH/nC<sub>60</sub> i H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> samo blago smanjivale vijabilitet ovih ćelija (Slika 4E i F), moglo se zaključiti da opisano delovanje koloida nije uslovljeno tipom ćelijske linije, niti vrstom organizma iz kojeg ćelije potiču.

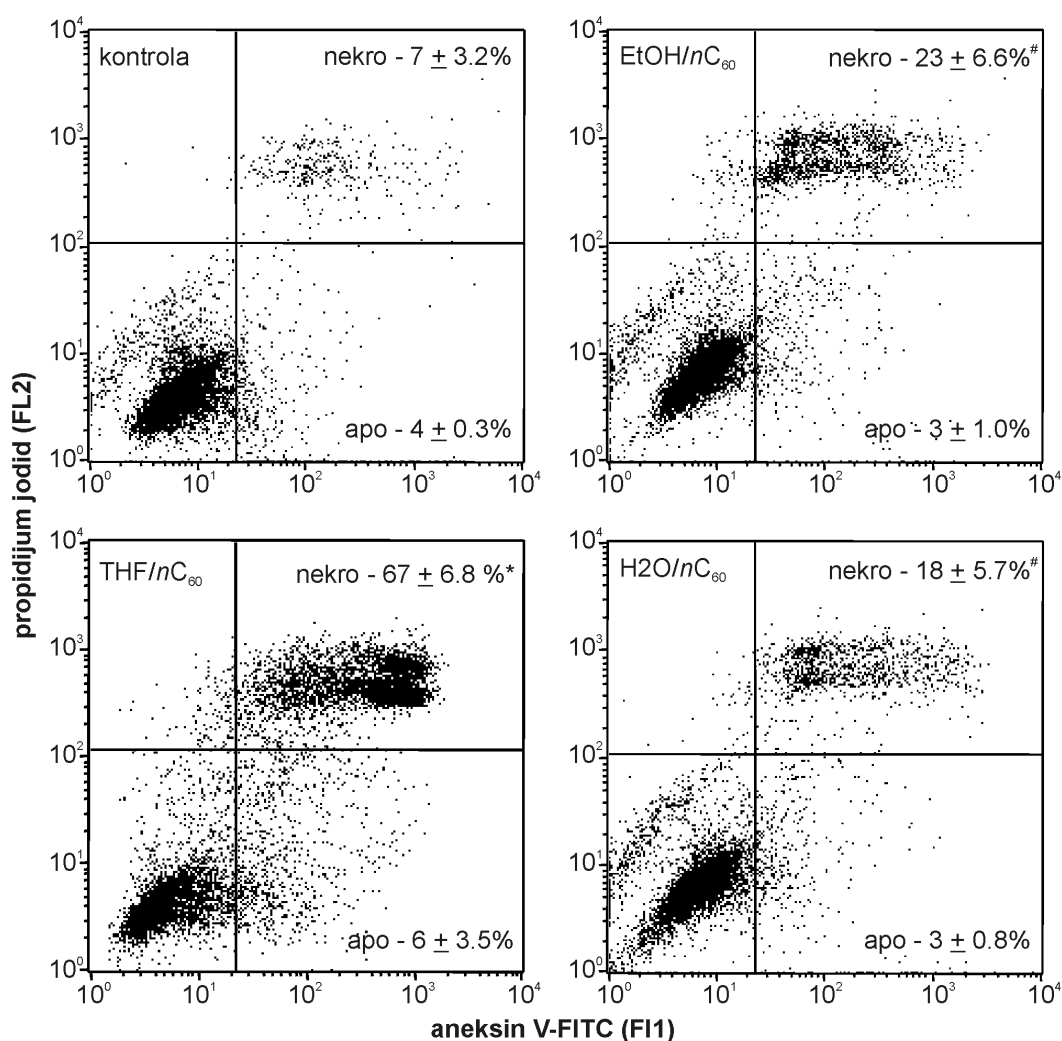


**Slika 4 . Efekti različitih nC<sub>60</sub> koloida na ćelijsku morfologiju i vijabilitet.** (A) NTCC ćelije tretirane rastvorima različitih nC<sub>60</sub> (1µg/ml, 48 h) posmatrane invertnim mikroskopom. (B) Vremenski zavisani uticaj različitih rastvora nC<sub>60</sub> (1µg/ml) na broj NTCC ćelija (kristal violet). (C) Promene u broju NTCC ćelija u zavisnosti od koncentracije različitih nC<sub>60</sub> koloidnih rastvora (mereno posle 48 h kristal violet testom). (D) Mitohondrijalna aktivnost (MTT) i oštećenje ćelijske membrane (LDH) kod NTCC ćelija koje su tretirane različitim rastvorima nC<sub>60</sub> (1µg/ml, posle 48 h). (E) Broj ćelija (kristal violet) i (F) mitohondrijalna aktivnost (MTT) kod HDF, L929 i B16 ćelijskih linija tretiranih sa različitim rastvorima nC<sub>60</sub> (1 µg/ml, posle 48 h). (B-F) Prikazani su reprezentativni rezultati iz najmanje tri eksperimenta kao srednja vrednost ± SD triplikata (\*<sup>#</sup> p < 0.05 u odnosu na sve druge tretmane \* ili na kontrolu <sup>#</sup>).



### 4.3. THF/nC<sub>60</sub> izaziva nekrozu NTCC ćelija

Prethodni rezultati pokazali su citotoksične efekte fullerenskih koloida, posebno THF/nC<sub>60</sub>. Da bi se utvrdilo na koji način nC<sub>60</sub> rastvori ispoljavaju svoj citotoksični efekat, odnosno da bi bio definisan tip ćelijske smrti koju izazivaju, izvršena je citofluorimetrijska analiza NTCC ćelija tretiranih 36 sati različitim fullerenskim koloidima u dozi od 1 µg/ml.

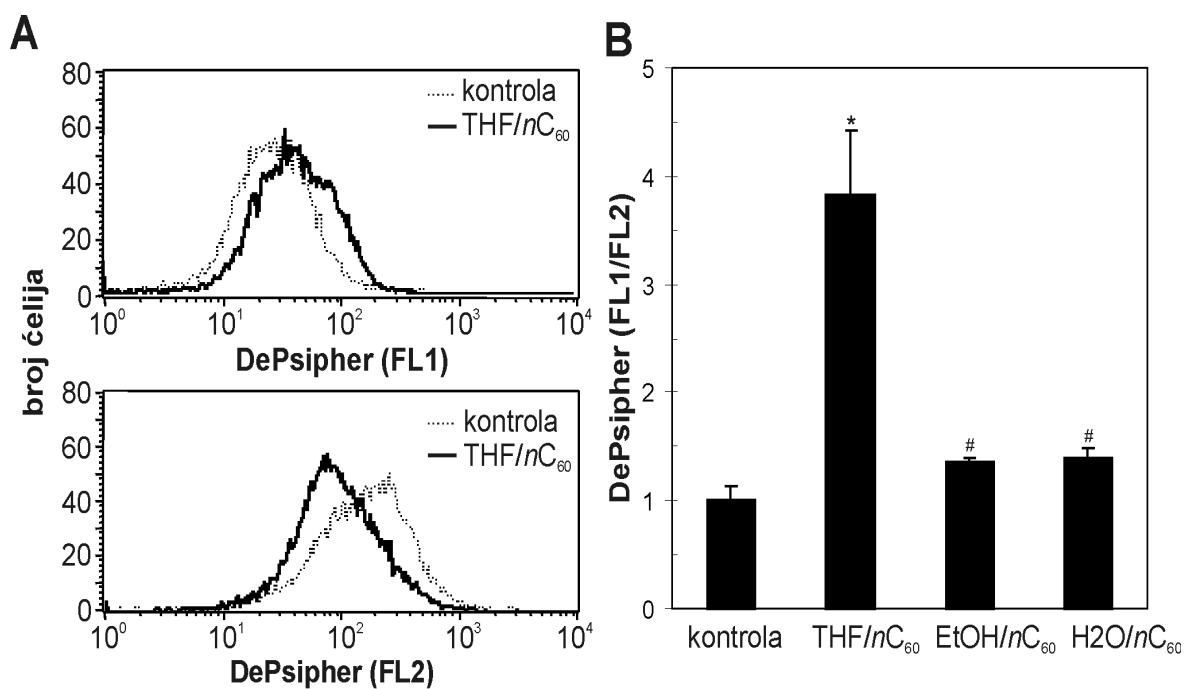


**Slika 5.** Sposobnost različitih nC<sub>60</sub> koloida da izazovu nekrozu NTCC ćelija. Protočnim citofluorimetrijom je analizirana indukcija nekroze NTCC ćelija tretiranih različitim nC<sub>60</sub> koloidima (1 µg/ml u toku 36 h). Prikazani su reprezentativni rezultati iz najmanje tri eksperimenta kao srednja vrednost ± SD (\*<sup>#</sup> p < 0.05 u odnosu na sve druge tretmane \* ili kontrolu <sup>#</sup>).

Ćelije su obojene fluorescentnim bojama aneksinV-FITC i propidijum jodidom. Dobijeni rezultati su potvrdili da THF/nC<sub>60</sub> indukuje nekrozu, tip ćelijske smrti koju karakteriše oštećenje ćelijske membrane, što je omogućilo da PI uđe u ćeliju i veže se za DNK. Sa druge strane, nije primećen porast u broju ćelija koje umiru apoptozom, drugim tipom ćelijske smrti. U procesu apoptoze ćelijska membrana ostaje netaknuta, ali dolazi do premeštanja fosfatidil-serina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane, što se detektuje porastom zelene fluorescence aneksinV-FITC-a, koji ima sposobnost da se vezuje za fosfatidil-serin. U poređenju sa THF/nC<sub>60</sub>, druga dva koloida su izazvala mali, ali evidentan porast u broju nekrotičnih ćelija (Slika 5).

#### **4.4. THF/nC<sub>60</sub> dovodi do depolarizacije mitohondrijalne membrane NTCC ćelija**

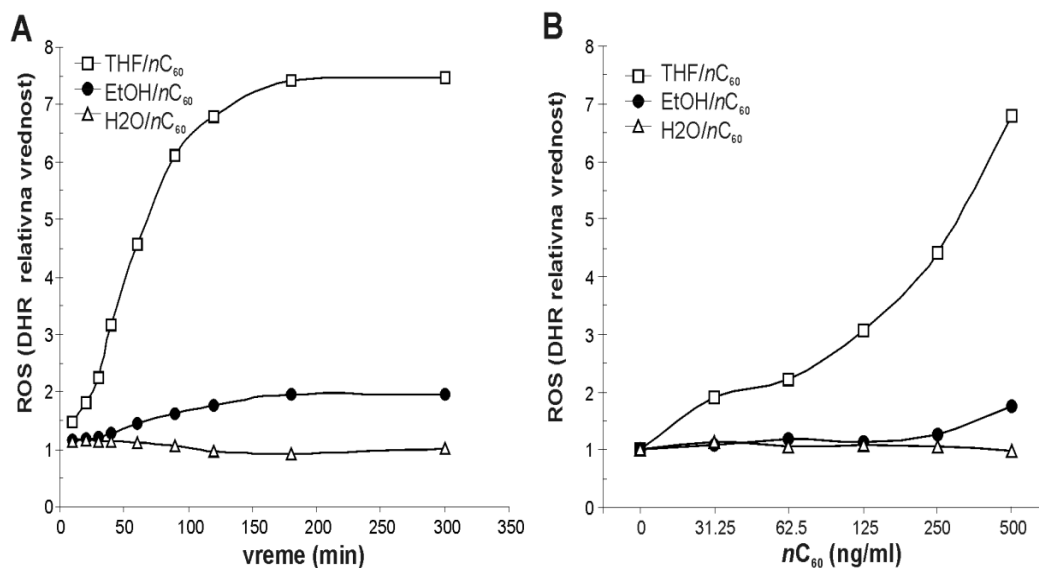
Pošto je nekroza često izazvana oštećenjem mitohondrija (Nakagawa, Shimizu i sar., 2005) dalje je ispitivano kako vodeni rastvori fulerena utiču na potencijal mitohondrijalne membrane. Tretirane ćelije su obojene DePsipher fluorescentnom bojom koja ulazi u mitohondrije i formira agregate, dajući crvenu fluorescencu. U slučaju poremećaja membranskog potencijala boja ne može da uđe u međumembranski prostor te zadržava zelenu fluorescencu. Analiza protočnim citofluorimetrom je pokazala da je THF/nC<sub>60</sub> tretman u trajanju od 24 sata doveo do značajnog pada mitohondrijalnog membranskog potencijala humanih keratinocita, što je pokazano porastom intenziteta zelene fluorescence u odnosu na crvenu (FL1/FL2) (Slika 6A i B). Stoga možemo da zaključimo da bi depolarizacija mitohondrijalne membrane mogla da doprinese THF/nC<sub>60</sub> indukovanoj nekrotičnoj ćelijskoj smrti. Sa druge strane, EtOH/nC<sub>60</sub> i H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> su bili očigledno manje efikasni u depolarisanju mitohondrija NTCC ćelija (Slika 6B), te je i na taj način potvrđeno da citotoksični potencijal nC<sub>60</sub> zavisi od rastvarača koji se koristi za njegovu pripremu.

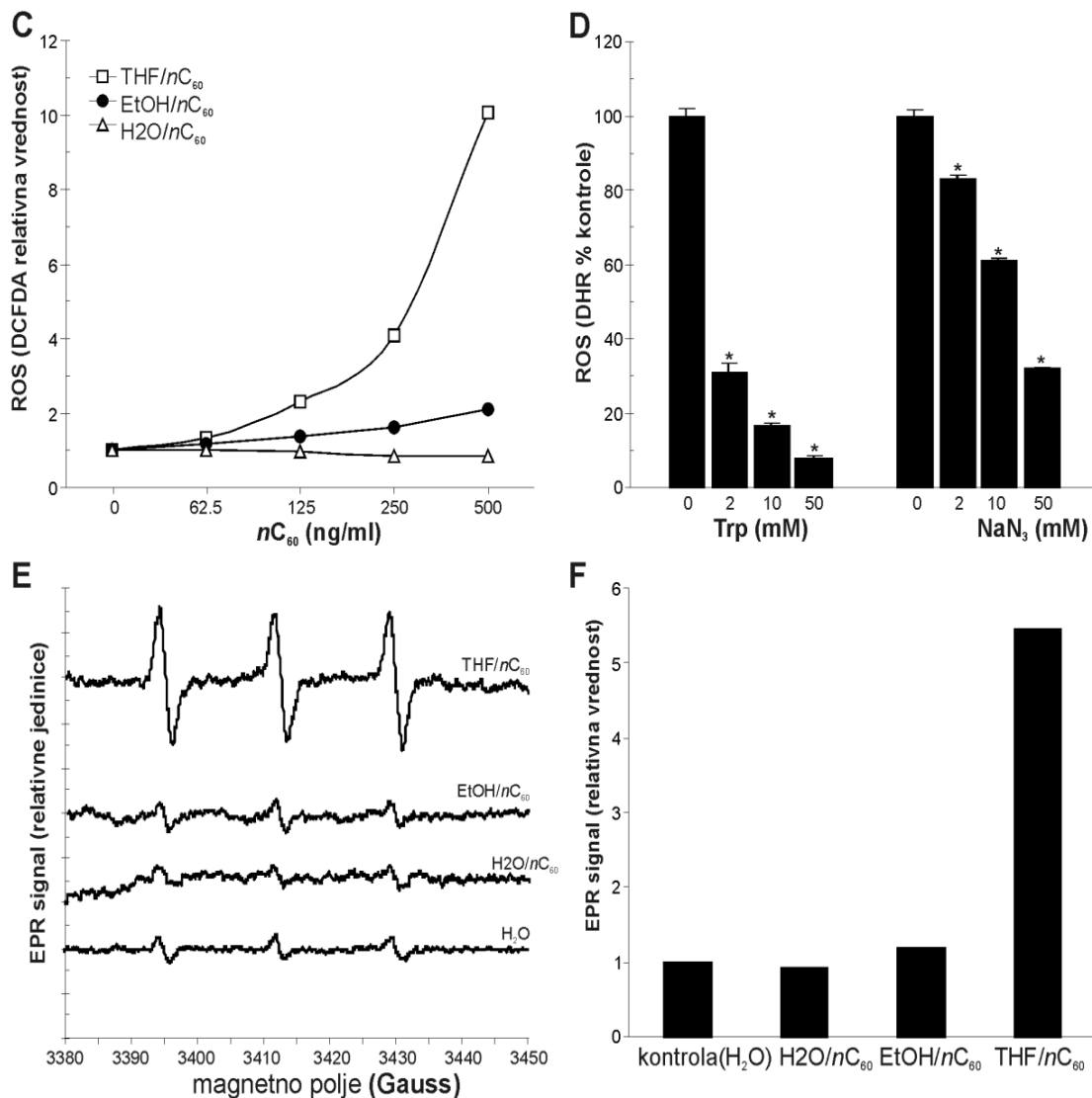


**Slika 6. Sposobnost različitih nC<sub>60</sub> da izazovu depolarizaciju mitohondrijalne membrane NTCC ćelija:** (A) Analiza potencijala mitohondrijalne membrane kod keratinocita NTCC tretiranih sa THF/nC<sub>60</sub> (1μg/ml, posle 24 h). Porast zelene fluorescence (FL1) zajedno sa padom vrednosti crvene fluorescence (FL2) posle tretmana sa THF/nC<sub>60</sub> ukazuje na depolarizaciju mitohondrijalne membrane. (B) Mitohondrijalna depolarizacija u NTCC ćelijama tretiranim sa različitim nC<sub>60</sub> (1μg/ml, 24 h) prikazana kao umnožak odnosa FL1/FL2 fluorescence DePsiphera. Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri eksperimenta kao srednja vrednost±SD (\*# p<0.05 je u odnosu na sve druge tretmane \* ili kontrolu #).

#### 4.5. nC<sub>60</sub> proizvode RKV u medijumu bez ćelija

S obzirom na to da je već pokazano da je citotoksičnost THF/nC<sub>60</sub> posredovana reaktivnim kiseoničnim vrstama (Sayes, Gobin i sar., 2005; Isakovic, Markovic i sar., 2006), izvršeno je poređenje efikasnosti različitih nC<sub>60</sub> u proizvodnji RKV. U tu svrhu su korišćene redoks-senzitivne fluorescentne boje DHR i DCFDA. Merenjem fluorescence na Chameleon-u pokazano je da nC<sub>60</sub> koloidi indukuju vremenski (Slika 7A) i dozno zavisnu (Slika 7B i 7C) produkciju RKV, pri čemu se mogla uočiti pozitivna korelacija između sposobnosti nC<sub>60</sub> koloida da generišu RKV i njihove citotoksičnosti (Slika 4B-D) (THF/nC<sub>60</sub>>EtOH/nC<sub>60</sub>>H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub>). Triptofan i natrijum azid, relativno specifični antioksidanti koji neutrališu singlet kiseonik (Matheson, Etheridge i sar., 1975) smanjili su intenzitet DHR fluorescence indukovane THF/nC<sub>60</sub>-om na dozno zavisnan način (Slika 7D). Na osnovu tog podatka može da se pretpostavi da je singlet kiseonik jedna od kiseoničkih vrsta koju proizvodi THF/nC<sub>60</sub>. U skladu sa tim, EPR spektar različitih nC<sub>60</sub> preparata je pokazao da THF/nC<sub>60</sub> generiše veoma snažan TEMPOL signal, dok je EtOH/nC<sub>60</sub> doveo tek do blagog porasta, a H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> nije uopšte povećao intenzitet signala (Slika 7E i F).

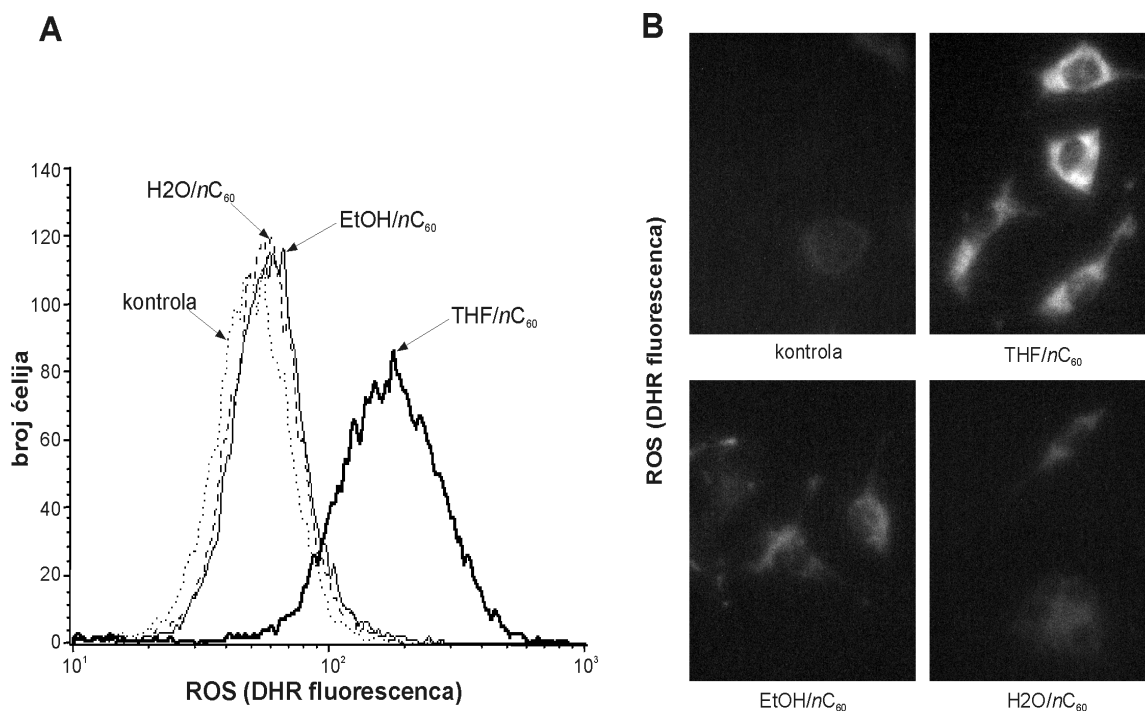




**Slika 7.  $nC_{60}$  čestice produkuju RKV u medijumu bez ćelija.** (A) Promena fluorescence DHR sa vremenom kao pokazatelj produkcije RKV u vodenom rastvoru  $nC_{60}$  (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ). (B, C) RKV produkcija zavisna od koncentracije različitih  $nC_{60}$  u vodi (120 min) merena kao porast fluorescence DHR (B) ili DCFDA (C). (D) Uticaj kvenčera singlet kiseonika ( $\text{NaN}_3$  i triptofana-Trp) na proizvodnju RKV izazvanu THF/ $nC_{60}$  nanočesticama (kontrola), merena kao fluorescencija DHR posle 120 minuta. (E, F) EPR merenje produkcije singlet kiseonika u rastvorima različitih  $nC_{60}$  u poređenju sa kontrolnim uzorkom koji sadrži vodu. (A–F) Prikazani su rezultati reprezentativnog od najmanje tri izvedena eksperimenta. Podaci u (A–D) su srednje vrednosti triplikata ( $\pm$  SD u D; SD vrednosti u A–C su se kretale do 10% srednje vrednosti; \* $p < 0.05$ )

#### 4.6. THF/nC<sub>60</sub> indukuje oksidativni stres u NTCC ćelijama

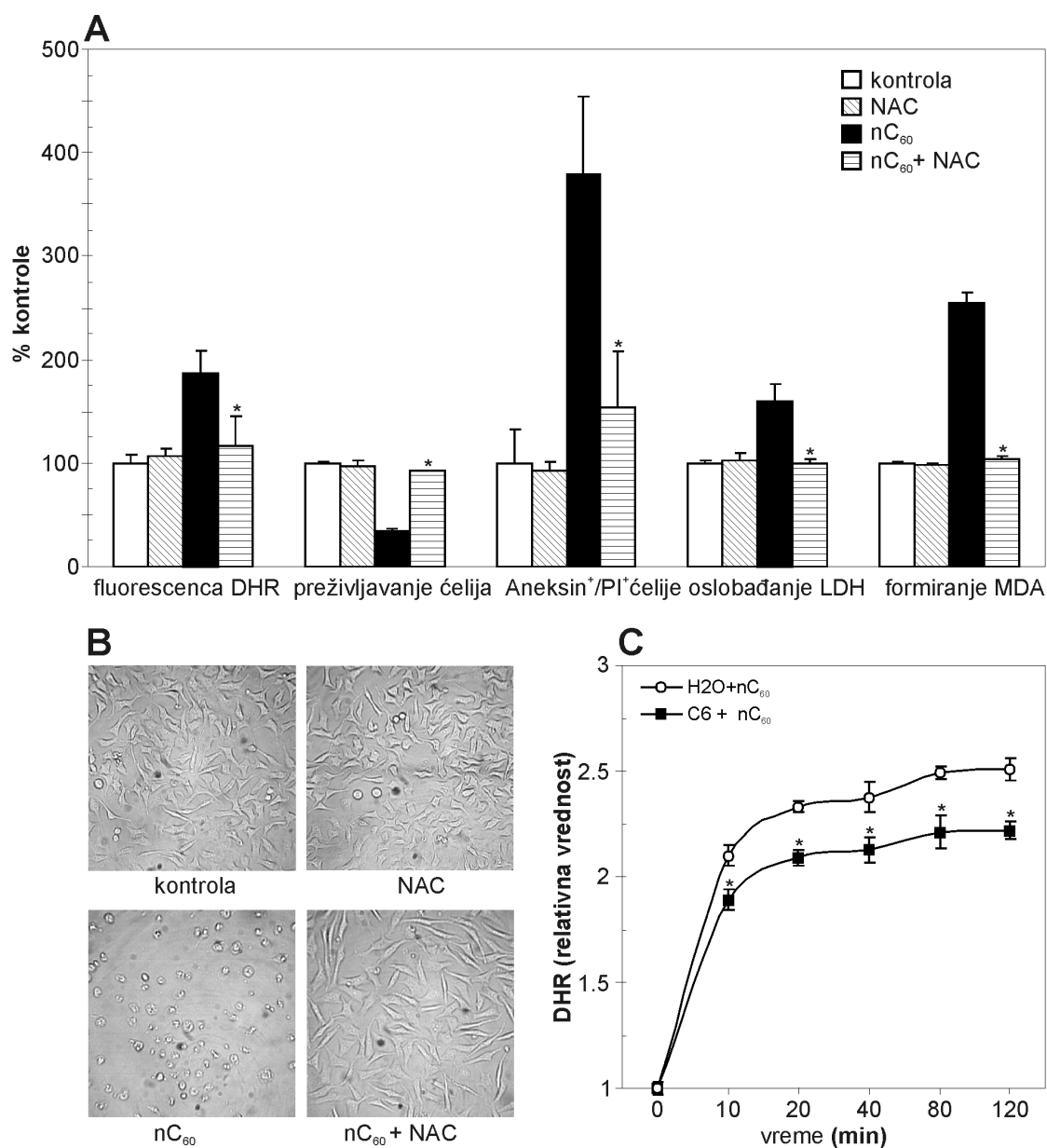
Kada u biološkom sistemu RKV nadvladaju ćelijske antioksidativne mehanizme, nastaje oksidativni stres (Orrenius, Gogvadze i sar., 2007). U fiziološkim uslovima RKV imaju ulogu u unutarćelijskom prenosu signala i regulisanju unutarćelijskih procesa, ali u slučaju neregulisane redoks ravnoteže mogu da dovedu do ćelijskog oštećenja i smrti (Ott, Gogvadze i sar., 2007). S obzirom na to da je merenje RKV u vodenom rastvoru pokazalo da postoje velike razlike u stepenu produkcije slobodnih kiseoničkih vrsta primenom nC<sub>60</sub> pripremljenih sa različitim rastvaračima, sledeća grupa eksperimenata je trebalo da ispita sposobnost različitih nC<sub>60</sub> da indukuju oksidativni stres u ćelijskoj liniji humanih keratinocita, koji su, za potrebe ovog eksperimenta, tretirani sa 1 µg/ml nC<sub>60</sub>. Analiza NTCC ćelija obojenih DHR, neselektivnom fluorescentnom bojom koja ima sposobnost da detektuje više različitih RKV i RNS, izvršena je protočnom citofluorimetrijom (Slika 8A). Dobijeni podaci su potvrdili rezultate dobijene u sistemu bez ćelija budući da je kod ćelija tretiranih sa THF/nC<sub>60</sub> detektovana najveća koncentracija RKV, dok je i kod tretmana sa EtOH/nC<sub>60</sub> i sa H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> primećen samo blagi porast fluorescence DHR (Slika 8A). Analiza fluorescentne mikroskopije ćelija obojenih DHR-om je potvrdila dobijeni rezultat, jer se značajna razlika u fluorescenci tretiranih ćelija u odnosu na kontrolne videla samo u tretmanu sa THF/nC<sub>60</sub> (Slika 8B). Dakle, vrsta rastvarača korišćenog u metodi zamene rastvarača za pripremu kristala nC<sub>60</sub> može da utiče na njihovu sposobnost da produkuju RKV i da indukuju oksidativni stres, a samim tim i da utiče na njihovu citotoksičnost.



**Slika 8. Proizvodnja RKV u NTCC ćelijama tretiranim  $nC_{60}$  koloidima.** (A) Detekcija unutarćelijske produkcije RKV (DHR fluorescencija, 180 min) protočnom citofluorimetrijom (B) i fluorescentnom mikroskopijom u NTCC ćelijama tretiranim različitim  $nC_{60}$  preparatima ( $1 \mu\text{g/ml}$ ).

#### 4.7 Uloga RKV u citotoksičnosti $nC_{60}$

Da bi se utvrdilo da li citotoksični efekat THF/ $nC_{60}$  potiče od oksidativnog stresa, ispitan je uticaj antioksidanta N-acetil-cisteina (NAC) na nekoliko parametara ćelijskog preživljavanja. NAC je značajno smanjio produkciju RKV indukovanu sa THF/ $nC_{60}$ , što je pokazano smanjenjem intenziteta fluorescencije redoks-senzitivne boje DHR u C6 ćelijskoj liniji (Slika 9A), te je na taj način potvrđena njegova uloga u inaktivaciji reaktivnih kiseoničnih vrsta. NAC je doveo do potpunog oporavka vijabiliteta ćelija tretiranih sa THF/ $nC_{60}$ , što je pokazano kristal violet testom (Slika 9A).



**Slika 9. Učešće RKV-a u citotoksičnosti nC<sub>60</sub>.** (A) C6 ćelije su inkubirane bez (kontrola) i sa nC<sub>60</sub> (1 µg/ml). Uticaj NAC (2 mM) na različite parametre ćelijske vijabilnosti utvrđen nakon tretmana C6 ćelija sa nC<sub>60</sub> (1 µg/ml) i to posle 3 h za DHR i MDA i posle 6 h za vijabilitet, broj aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> ćelija i oslobađanje LDH. (B) Svetlosna mikroskopija L929 ćelija inkubiranih 24 h bez (kontrola) i sa nC<sub>60</sub> (1 µg/ml), sa ili bez NAC (2 mM). (C) Sposobnost nC<sub>60</sub> (1 µg/ml) da generiše RKV u C6 ćelijskoj kulturi i rastvoru bez ćelija je utvrđena merenjem fluorescencije DHR. Vrednosti u A i C prikazane su kao srednja vrednost ± SD triplikata iz reprezentativnog od najmanje tri eksperimenta, sa izuzetkom vrednosti za DHR i aneksin/PI ćelije u A, koji su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD tri različita eksperimenta (\*p < 0.05 je u odnosu na nC<sub>60</sub> tretman bez NAC (A) ili na odgovarajuću DHR vrednost dobijenu u uslovima bez ćelija (C)).

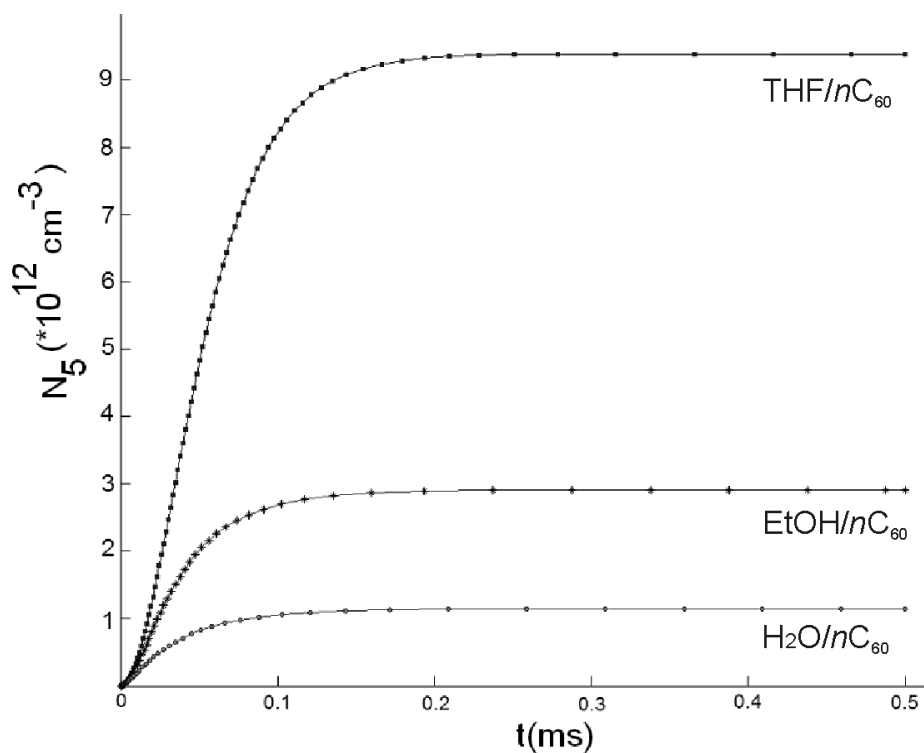


Takođe, doveo je do smanjene indukcije nekroze što je pokazano citofluorimetrijskom analizom aneksin/PI obeleženih ćelija tretiranih sa THF/nC<sub>60</sub> (Slika 9A). Sa istim tretmanom NAC je doveo do smanjenog oslobađanja laktat dehidrogenaze, čime je pokazano da sprečava oštećenje ćelijske membrane (Slika 9A). Uz to je efikasno sprečio porast nivoa MDA, koji nastaje peroksidacijom membranskih lipida, u tretmanu sa fullerenskim koloidom (Slika 9A). Svetlosna mikroskopija L929 ćelija koje su tretirane sa 1 µg/ml THF/nC<sub>60</sub>, sa ili bez NAC-a, su pokazale da NAC ispoljava citoprotektivni efekat jer je u potpunosti očuvao morfologiju ćelija tretiranih sa THF/nC<sub>60</sub> (Slika 9B). Svi ovi rezultati ukazuju da oksidativni stres izazvan THF/nC<sub>60</sub> učestvoje u oštećenju ćelija, odnosno indukciji nekrotične ćelijske smrti. Zbog nemogućnosti da se analizom fluorescentnog signala izazvanog produkcijom RKV u ćelijskoj suspenziji razluči poreklo reaktivnih čestica, izmerena je DHR fluorescencija u rastvoru THF/nC<sub>60</sub> sa i bez ćelija. Dobijeni podaci pokazuju da je vremenski-zavisan porast DHR fluorescencije manje izražen na C6 ćelijama tretiranim sa THF/nC<sub>60</sub> nego u *in vitro* uslovima bez ćelija (Slika 9C). Stoga se čini da unutarćelijski porast u produkciji RKV ne predstavlja ćelijski odgovor na tretman koloidalnim fulerenom, nego pre ocrta sposobnost samog fulerena da generiše kiseonične radikale.

#### 4.8. Teorijska analiza produkcije RKV kod različitih fullerenskih koloida

Da bi dobili dodatni uvid u mehanizme koji se nalaze u osnovi utvrđenih razlika u toksičnosti nC<sub>60</sub> uslovljenoj proizvodnjom RKV, razvijen je kinetički model za izračunavanje intenziteta kojim različiti fullerenski koloidi proizvode RKV. Naši eksperimentalni podaci ukazuju na to da vodeni rastvori nC<sub>60</sub> zadržavaju sposobnost fulerena C<sub>60</sub> rastvorenog u organskim rastvaračima da proizvodi RKV (Guldi i Prato, 2000). Na osnovu podatka da skoro 10% ukupne količine THF ostaje ugrađeno u slojevima kristala nC<sub>60</sub>, tokom njegove pripreme (Fortner, Lyon i sar., 2005), matematički model pretpostavlja da je unutrašnjost kristala nC<sub>60</sub> ispunjena organskim rastvaračem (THF-om, etanolom ili vodom). Može se reći da je nanokristal sastavljen od fulerena koji proizvodi singlet kiseonik i rastvarača koji ga neutrališe. Rezultati izračunatih vrednosti koncentracija osnovnog stanja <sup>1</sup>O<sub>2</sub> su 1.1, 2.9 i 9.4 x 10<sup>12</sup> cm<sup>-3</sup> za

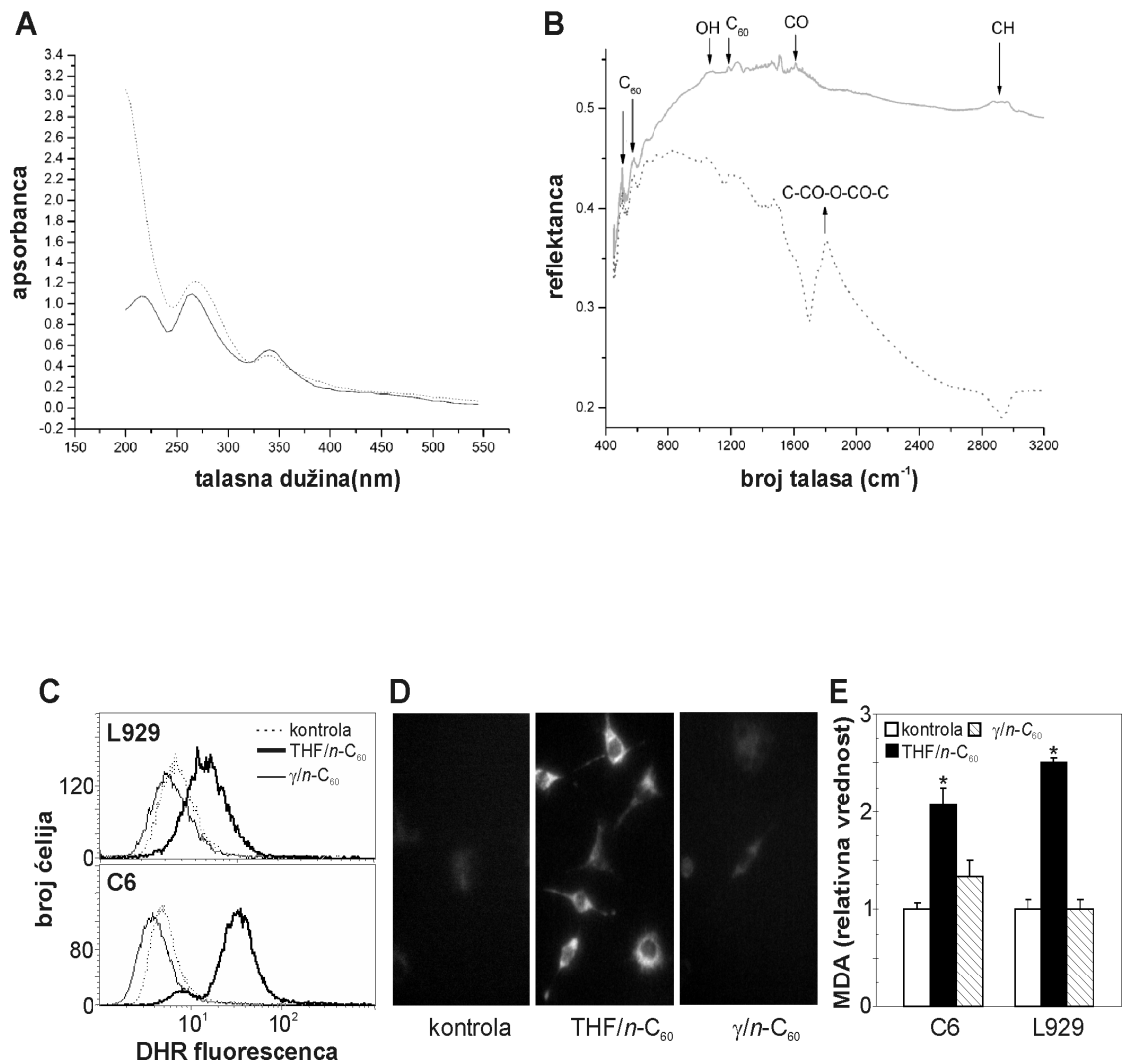
fulerenske nanokristale obložene vodom, etanolom i THF-om, tim redosledom. Iz ovih rezultata se može zaključiti da bi THF/nC<sub>60</sub> trebalo da bude efikasniji u generisanju singlet kiseonika nego etanolski ili vodeni fullerenski preparat, sa efikasnošću većom od 90 % u pretvaranju kiseonika u osnovnom stanju u singlet formu. Dakle, matematičko predviđanje efikasnosti generisanja <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (THF/nC<sub>60</sub> > EtOH/nC<sub>60</sub> > aqu/nC<sub>60</sub>) u potpunosti korelira sa eksperimentalnim merenjem RKV sinteze i citotoksičnosti (Fig. 6B), sugerišući da se prooksidativna/citotoksična aktivnost nC<sub>60</sub> može odrediti sposobnošću interkaliranog rastvarača da vezuje singlet kiseonik.



**Slika 10. Teorijsko modelovanje produkcije singlet kiseonika nC<sub>60</sub> obloženih različitim rastvaračima:** Matematičko modelovanje nC<sub>60</sub> generisanja <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Parametri su P = 20mW/cm<sup>2</sup>, N<sub>F</sub> = 10<sup>21</sup> cm<sup>-3</sup>, No<sub>2</sub> = 10<sup>13</sup> cm<sup>-3</sup>.

#### **4.9 THF/nC<sub>60</sub> izložen $\gamma$ -zračenju gubi sposobnost da proizvodi RKV i izaziva oštećenje ćelijske membrane**

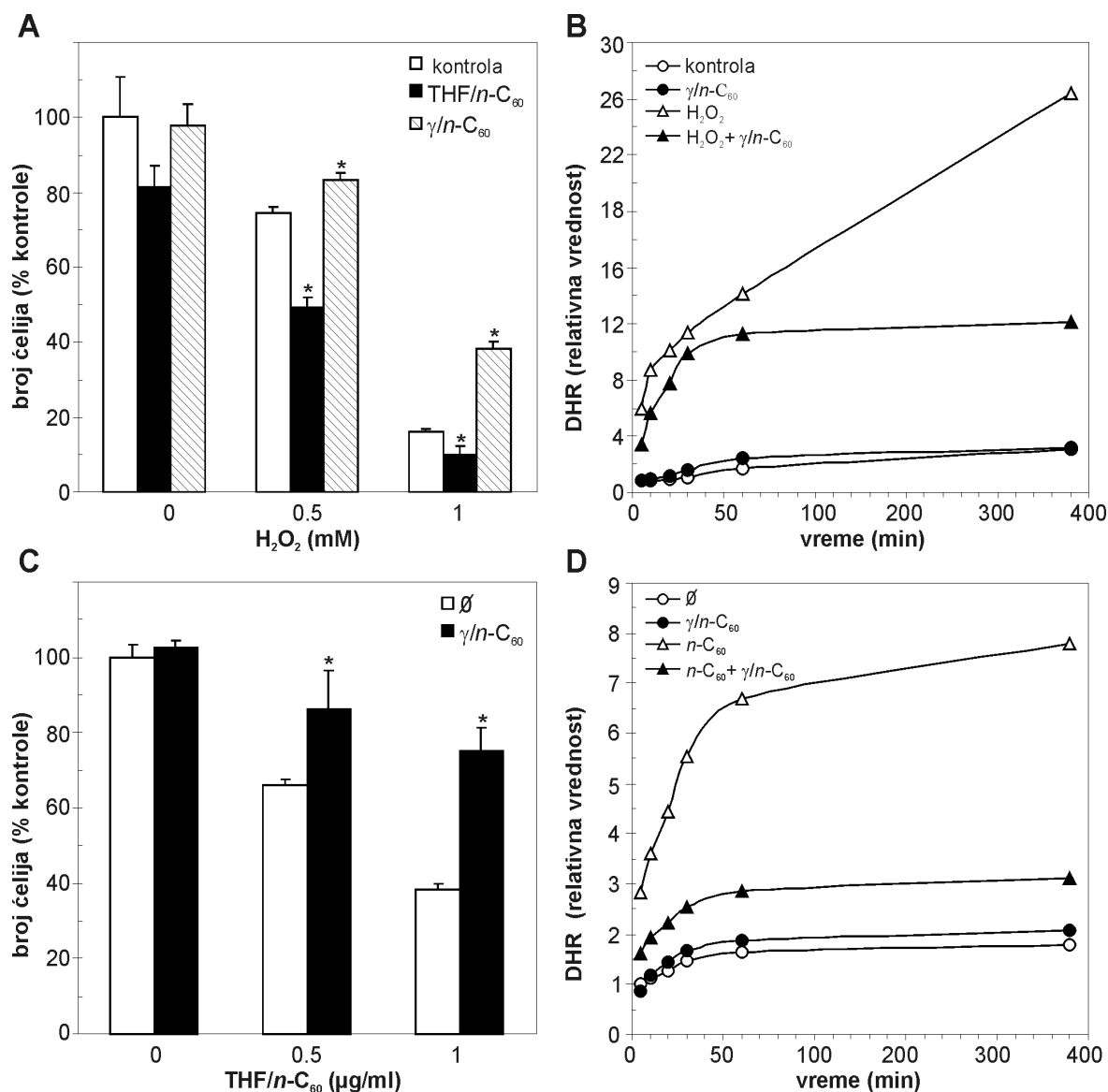
Da bi uloga THF u citotoksičnosti THF/nC<sub>60</sub> bila ispitana, rastvor je izložen gama zračenju (11.3 kGy/h) u trajanju od 3 h. Pretpostavka je bila da će u tom procesu doći do razgradnje THF (Baxendale, Beaumont i sar., 1970). Analiza UV spektra je potvrdila da  $\gamma$ -ozračeni THF/nC<sub>60</sub> odlikuje apsorpcioni spektar karakterističan za C<sub>60</sub>, sa blagim povećanjem apsorpcije u dubokom UV regionu (Slika 10A). To ukazuje na očuvanost fullerenskog kaveza posle gama-zračenja, što je u skladu sa rezultatima dobijenim zračenjem čistog C<sub>60</sub> u praškastom obliku (Albarrán, Basiuk i sar., 2004). U skladu sa već postojećim podacima, detekcija apsorpcionih traka karakterističnih za CO i CH u FTIR spektru THF/nC<sub>60</sub> ukazala je na prisustvo THF (Andrievsky, Kosevich i sar., 1995; Brant, Lecoanet i sar., 2005; Fortner, Lyon i sar., 2005 {Andrievsky, 2002 #33217), dok je prisustvo OH trake bilo u skladu sa površinskom derivatizacijom nanokristala C<sub>60</sub> (Fortner, Lyon i sar., 2005). Kod gama ozračenog THF/nC<sub>60</sub> se takođe javljaju vibracione trake karakteristične za C<sub>60</sub>, ali dolazi do gubitka CO i CH apsorpcionih traka, kao i do pojave apsorpcione trake za anhidridnu grupu, što sve ukazuje na razgradnju THF molekula u nanokristalu (Slika 10B). Da bi se ispitao uticaj  $\gamma$ -zračenja na prooksidativni efekat THF/nC<sub>60</sub>, L929 i C6 ćelijske linije su tretirane sa ozračenim i neozračenim nanokoloidom i zatim obojene redoks-senzitivnom DHR bojom. Rezultati analize protočnom citofluorimetrijom i fluorescentnom mikroskopijom jasno su pokazali da je THF/nC<sub>60</sub> izložen gama zračenju izgubio sposobnost da proizvodi RKV u odnosu na neozračeni nanokristal, jer se intenzitet fluorescence DHR smanjilo gotovo na nivo kontrolnog uzorka (Slika 10C i D). Zatim je ispitano intenzitet lipidne peroksidacije, kao mere RKV-om izazvanog oštećenja ćelijske membrane, i to kolorimetrijskim određivanjem količine MDA u tretiranim ćelijama. Dobijeni rezultat je pokazao porast peroksidacije membranskih lipida kod THF/nC<sub>60</sub>, ali ne i kod  $\gamma$ -ozračenog nanokristala (Slika 10E), što potvrđuje odsustvo sposobnosti ozračenog koloida da indukuje oksidativni stres.



**Slika 10. Gama zračenje blokira proizvodnju RKV izazvanu THF/*n*C<sub>60</sub>. Karakterizacija THF/*n*C<sub>60</sub> (puna linija) i  $\gamma$ /*n*C<sub>60</sub> (tačkasta linija) (A) UV-vis i (B) FTIR spektroskopskim analizama. Proizvodnja RKV je analizirana merenjem fluorescence DHR u C6 i L929 ćelijama tretiranim 3 h sa THF/*n*C<sub>60</sub> ili  $\gamma$ /*n*C<sub>60</sub> (1  $\mu$ g/ml) i analiziranim (C) protočnom citofluorimetrijom ili (D) fluorescentnim mikroskopom u C6 ćelijama. (E) Malondialdehid (MDA), indikator lipidne peroksidacije, je meren u C6 i L929 ćelijama posle 6 h inkubacije sa 1  $\mu$ g/ml THF/*n*C<sub>60</sub> ili  $\gamma$ /*n*C<sub>60</sub>. (E) Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD triplikata iz reprezentativnog od najmanje tri eksperimenta (\**p* < 0.05 je u odnosu na kontrole i tretman sa ozračenim *n*C<sub>60</sub>).**

#### 4.10. $\gamma$ / nC<sub>60</sub> pokazuje citoprotektivno svojstvo

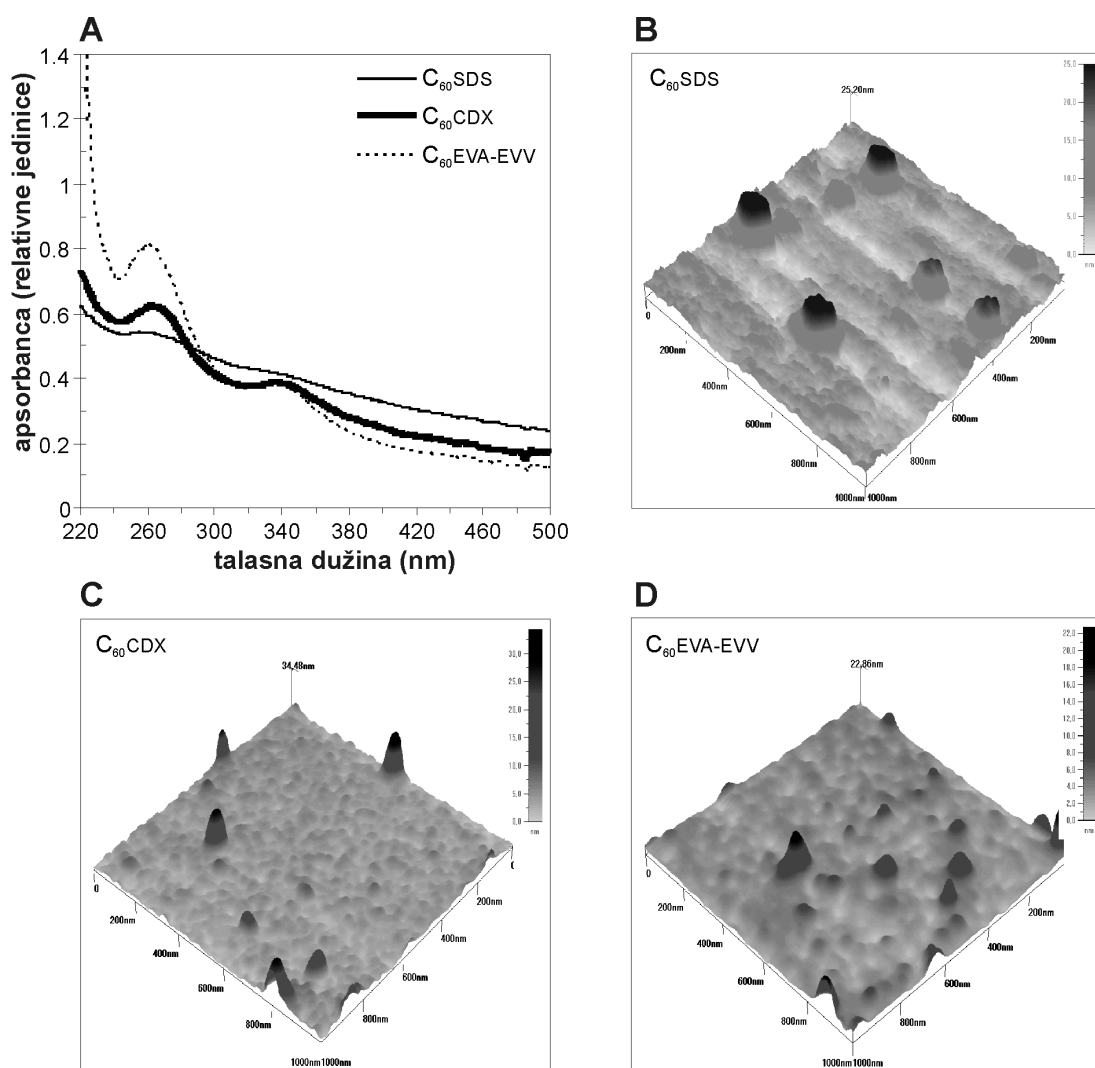
Za fuleren C<sub>60</sub> je poznato da poseduje antioksidativna svojstva, odnosno da je „sunder“ za slobodne radikale (Krusic, Wasserman i sar., 1991). Međutim, naši rezultati su pokazali da pripremljen metodom izmene rastvarača uz upotrebu THF dobija potpuno drugačija svojstva, intenzivno produkuje RKV i veoma je citotoksičan. S obzirom na to da je utvrđeno da se citotoksičnost THF/nC<sub>60</sub> gubi posle  $\gamma$ -zračenja, pokušali smo da ispitamo potencijalne citoprotektivne efekte ovako pripremljenog fulerena. Imajući u vidu da je FTIR spektar ozračenog THF/nC<sub>60</sub> ukazao na degradaciju THF u nanokristalu (Slika 10B), mogli je da se očekuje da nC<sub>60</sub> povрати antioksidativna svojstva fulerena C<sub>60</sub>. Da bi se ova pretpostavka ispitala testirana je sposobnost  $\gamma$ /nC<sub>60</sub> da zaštiti ćelije od toksičnog efekta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, poznatog induktora oksidativnog stresa. L929 ćelije su tretirane različitim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sa ili bez THF/nC<sub>60</sub> ili  $\gamma$ /nC<sub>60</sub>. Za razliku od THF/nC<sub>60</sub> koji je potencirao citotoksičnost vodonik peroksida, ozračeni nC<sub>60</sub> je delimično inhibirao njegov toksični efekat (Slika 11A). Citoprotektivni efekat  $\gamma$ /nC<sub>60</sub> je posledica njegove antioksidativne aktivnosti, jer je u tretmanu sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i FeSO<sub>4</sub> pokazano da  $\gamma$ /nC<sub>60</sub> dovodi do smanjenja fluorescence redoks senzitivne boje DHR, najverovatnije eliminacijom RKV nastalih u Fentonovoj reakciji (Slika 11B).  $\gamma$ /nC<sub>60</sub> je uz to značajno blokirao produkciju RKV i inhibirao citotoksičnost nezračenog nC<sub>60</sub>, što je jasno uočljivo iz rezultata kristal violet testa (Slika 11C i D) i dodatno potvrđuje da  $\gamma$  zračenje dovodi do konverzije toksičnog THF/nC<sub>60</sub> u antioksidativnu/citoprotektivnu formu fulerenskih nanočestica.



**Slika 11.** THF/nC<sub>60</sub> koloid izložen γ/zračenju je citoprotektivan. (A, C) L929 ćelije su tretirane različitim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sa ili bez 0.5 µg/ml THF/nC<sub>60</sub> ili γ/nC<sub>60</sub> (A), ili su THF/nC<sub>60</sub>-tretirane L929 ćelije bile inkubirane sa 0.5 µg/ml γ/nC<sub>60</sub> (C). Broj ćelija je utvrđen posle 24 h kristal violet testom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD triplikata (\*p < 0.05) iz reprezentativnog od tri eksperimenta. (B, D) Uticaj γ/nC<sub>60</sub> na RKV produkciju u vodenom rastvoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + FeSO<sub>4</sub> (oba 0.1 mM) (B) ili THF/nC<sub>60</sub> (1 µg/ml) (D) je utvrđen merenjem fluorescence DHR.

#### 4.11. Karakterizacija mehanohemijski pripremljenih fulerena

S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali da je organski rastvarač THF odgovoran za citotoksičnost fulerenskih koloida, sintetisani su fulerenski preparati bez upotrebe organskih rastvarača i to mehanohemijskom sintezom, uz korišćenje anjonskog surfaktanta SDS, oligosaharida  $\gamma$ -ciklodekstrina (CDX) i kopolimera EVA-EVV.



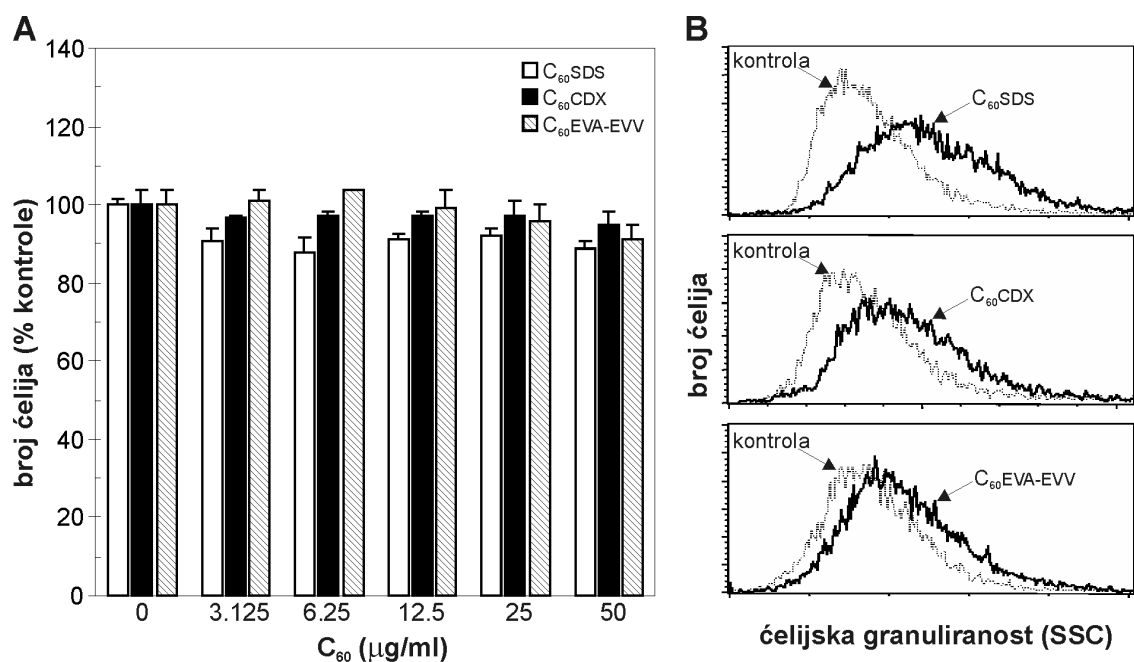
Slika 12. Karakterizacija C<sub>60</sub> nanočestica: (A) UV-vis spektri C<sub>60</sub> nanočestica (B-D) AFM analiza C<sub>60</sub>SDS (B), C<sub>60</sub>CDX (C), C<sub>60</sub>EVA - EVV (D).

Analiza UV spektra je potvrdila da  $C_{60}$ CDX i  $C_{60}$ EVA-EVV imaju apsorpcioni spektar tipičan za  $C_{60}$  (Slika 12A). Sa druge strane, apsorpcioni pikovi karakteristični za  $C_{60}$  se jedva primećuju kod suspenzije  $C_{60}$ SDS, što ukazuje na moguću hemijsku modifikaciju fulerena  $C_{60}$  u ovom preparatu (Slika 12A). AFM analiza AFM je otkrila da fuleren  $C_{60}$  i agensi korišćeni za rastvaranje formiraju aglomerate sa prosečnim veličinama od 100 nm za  $C_{60}$ SDS, 80 nm za  $C_{60}$ CDX i 45 nm za  $C_{60}$ EVA-EVV (Slika 12B, C i D). Takođe, čini se da su suspenzije  $C_{60}$ CDX i  $C_{60}$ EVA-EVV sastavljene od pojedinačnih čestica (Slika 12C i D), dok se u suspenziji  $C_{60}$ SDS formiraju grozdovi nanočestica (Slika 12B).

#### **4.12. Mehanohemijski pripremljeni fulereni nisu citotoksični**

U narednim eksperimentima su ispitivani potencijalni citotoksični efekti fulerenskih nanočestica pripremljenih mehanohemijskom metodom. L929 ćelije mišijeg fibrosarkoma su inkubirane sa različitim koncentracijama  $C_{60}$ SDS,  $C_{60}$ CDX i  $C_{60}$ EVA-EVV u trajanju od 24 h. Bojenje kristal violetom je pokazalo da preparati fulerena nisu ispoljili citotoksičan efekat prema tretiranim ćelijama kada su bili primenjeni u koncentracijama nižim od 50  $\mu$ g/ml (Slika 13A). Da bi se utvrdilo da li je uzrok nedostatka citotoksičnog dejstva smanjeno preuzimanje nanočestica od strane tretiranih ćelija, izvršena je citofluorimetrijska analiza ćelijske granuliranosti. Rezultati su pokazali da je ćelijska granuliranost značajno povećana posle kratkoročnog tretmana (4 h) sa sva tri fulerenska preparata. To ukazuje na to da su  $C_{60}$ SDS,  $C_{60}$ CDX i  $C_{60}$ EVA-EVV uspeli da prodru u L929 ćelije (Slika 13B). Može se zaključiti da mehanohemijski pripremljeni fulereni nisu citotoksični iako imaju sposobnost da uđu unutar ćelije.

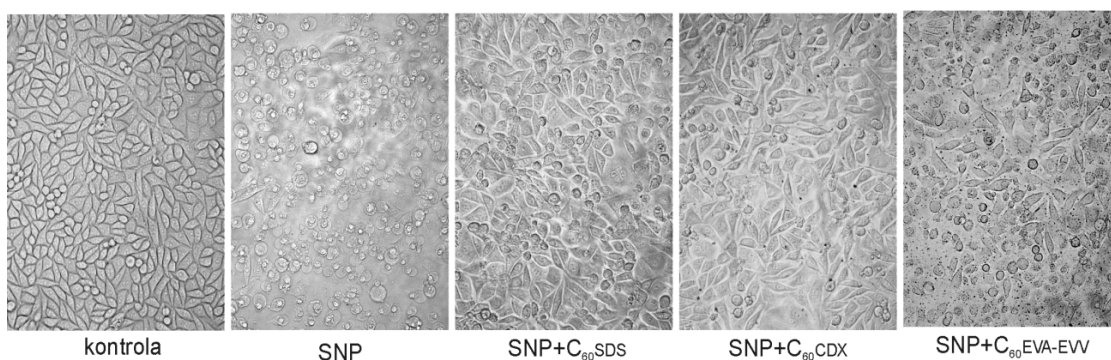
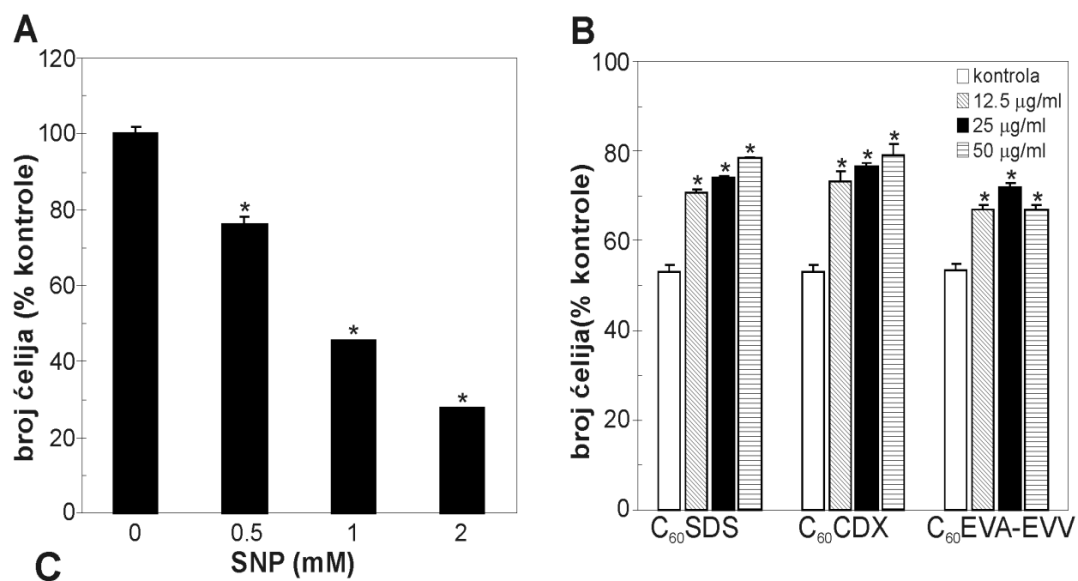




**Slika 13. Mehanohemijski pripremljene  $C_{60}$  nanočestice ulaze u ćelije, ali nisu citotoksične.** (A) L929 ćelije su tokom 24 h inkubirane sa različitim koncentracijama  $C_{60}$  nanočestica, a zatim je broj ćelija utvrđen bojenjem kristal violetom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD vrednosti triplikata reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. (B) L929 ćelije su 4 h inkubirane sa 50  $\mu\text{g/ml}$   $C_{60}$  nanočestica i ćelijska granuliranost (SSC), kao merilo unutarćelijskog prisustva nanočestica, ispitana je protočnom citofluorimetrijom.

#### 4.13. Mehanohemijski sintetisane $C_{60}$ nanočestice inhibiraju ćelijsku smrt indukovanu NO-om

Za  $C_{60}$  nanočestice rastvorene uz korišćenje deterdženta (Tween) je već pokazano da imaju protektivnu ulogu u modelu RKV-indukovanog oštećenja jetre kod pacova (Gharbi, Pressac i sar., 2005), dok su supramolekularni kompleksi  $C_{60}$  sa polivinilpirolidonom ili  $\gamma$ -ciklodekstrinom pokazali izraženu antioksidativnu aktivnost u različitim *in vitro* sistemima (Takada, Kokubo i sar., 2006). Da bi se ispitala sposobnost  $C_{60}$  nanokompleksa da neutrališu citotoksičnost NO, L929 ćelije su bile tretirane različitim koncentracijama donora NO natrijum nitroprusida (SNP). U skladu sa očekivanjima, kristal violet testom je pokazano dozno zavisno smanjenje vijabiliteta u prisustvu SNP kao egzogenog izvora NO (Slika 14A).

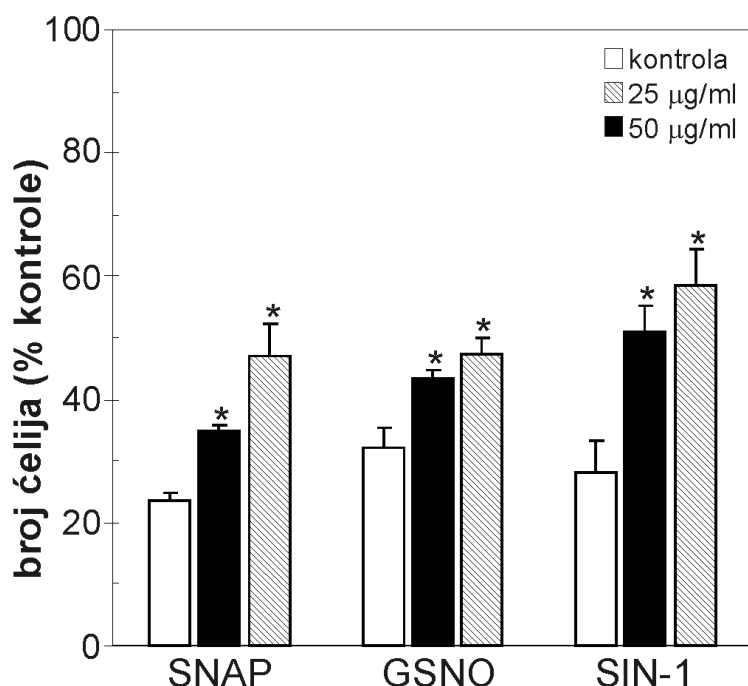


**Slika 14. C<sub>60</sub> nanočestice smanjuju toksičnost NO.** (A) L929 ćelije su 24 h inkubirane sa različitim koncentracijama NO donora SNP i broj ćelija je utvrđen kristal violet testom. (B, C) L929 ćelije su inkubirane sa SNP (1 mM) u prisustvu ili odsustvu različitih koncentracija (B) ili 50 µg/ml (C) C<sub>60</sub> nanočestica. Nakon 24 h je utvrđen broj ćelija kristal violet testom (B) ili je fazno-kontrastnim mikroskopom ispitana ćelijska morfologija (C). Podaci u (A, B) su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD vrednosti triplicate iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\*p < 0.05 je u odnosu na kontrolu (A) ili ćelije tretirane SNP-om (B)).

To je bilo potvrđeno i ispitivanjem ćelijske morfologije invertnom fazno-kontrastnom mikroskopijom (Slika 14C). Smanjenje broja ćelija i promene u ćelijskoj morfologiji koje izaziva SNP su bili delimično umanjene kotretmanom sa C<sub>60</sub>SDS, C<sub>60</sub>CDX ili C<sub>60</sub>EVA-EVV (Slika 14A i C). S obzirom na to da je C<sub>60</sub>EVA-EVV bio manje efikasan u protekciji ćelija od azot monoksida (Slika 14B) i da je pokazano da stvara velike agregate u ćelijskom medijumu (Slika 14C), dalji eksperimenti su nastavljeni sa C<sub>60</sub>SDS i C<sub>60</sub>CDX.

#### 4.14 C<sub>60</sub>SDS smanjuje citotoksičnost NO donora

Da bi se potvrdilo protektivno dejstvo mehanohemijski sintetisanih fullerenskih nanočestica od citotoksičnosti izazvane NO-om, ispitano je da li ove nanočestice pokazuju isti efekat i u slučaju ćelijske smrti izazvane strukturno različitim NO donorima kao što su GSNO, SNAP i SIN-1.

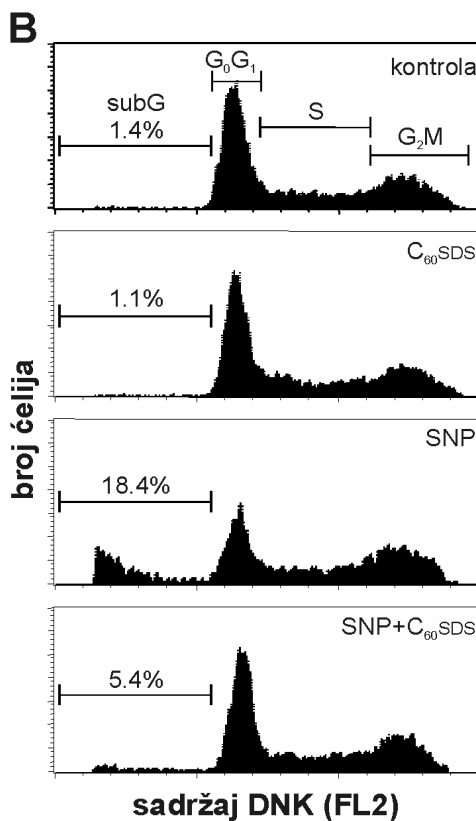
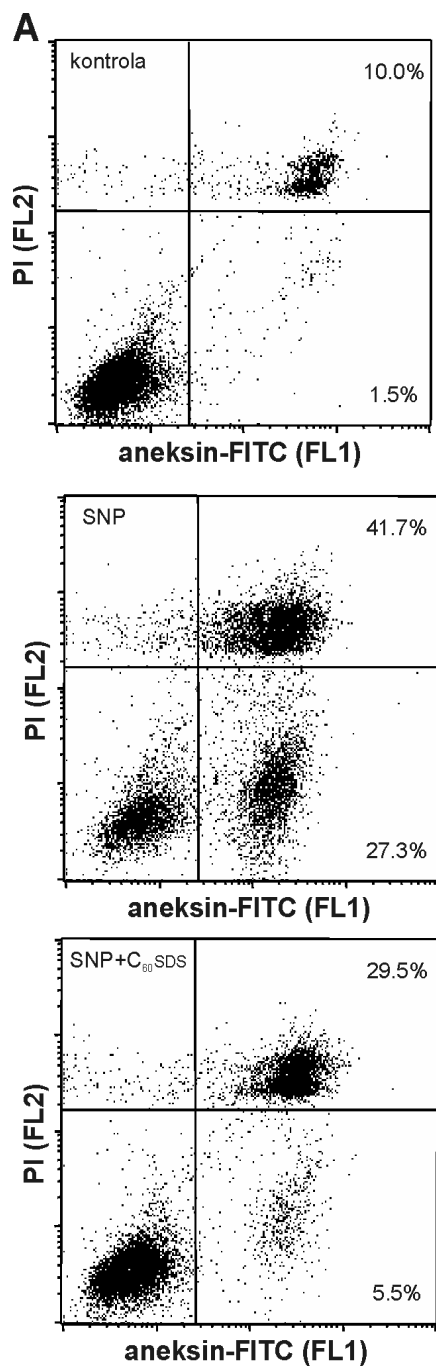


**Slika 15. C<sub>60</sub> nanočestice smanjuju citotoksičnost različitih NO donora.** L929 ćelije su inkubirane 24 h sa NO donorima SNAP, GSNO i SIN-1 (1 mM), sa ili bez različitih koncentracija (25 i 50 µg/ml) C<sub>60</sub>SDS nanočestica. Posle 24 h broj ćelija je utvrđen kristal violet testom. Podaci su srednje vrednosti ± SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\*p < 0.05 je u odnosu na ćelije tretirane odgovarajućim NO donorom).

Rezultati su pokazali da C<sub>60</sub>SDS efikasno smanjuje toksičnost sva tri NO donora azot, te je na taj način potvrđena sposobnost C<sub>60</sub> nanočestica da delimično neutrališu citotoksično dejstvo NO-a.

#### 4.15. C<sub>60</sub>SDS smanjuje proapoptotsko dejstvo NO

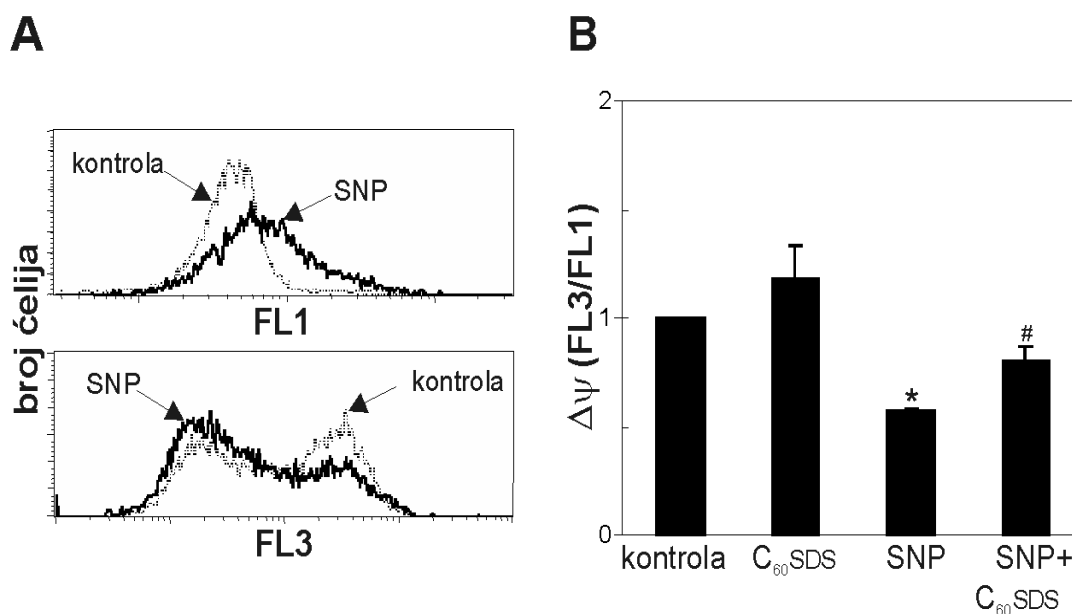
S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali da mehanohemijski sintetisani fulereni ispoljavaju citoprotektivni efekat, sledeća grupa eksperimenata trebalo je podrobnije da ispita mehanizme ovog dejstva. Da bi se utvrdilo na koji tip ćelijske smrti izazvane NO-om utiče C<sub>60</sub>SDS, L929 ćelije su dvostruko obojene aneksinom i propidijum jodidom, koji omogućavaju razlikovanje ćelija koje umiru apoptozom i nekrozom. Kod ćelija tretiranih SNP-om došlo je do porasta broja ćelija u ranoj apoptozi, kao i ćelija koje su ušle u kasnu apoptozu, odnosno nekrozu. Tretman ovih ćelija C<sub>60</sub>SDS-om je značajno ublažio apoptozu indukovanu NO-om, što se videlo kroz smanjenje nivoa prelaska fosfatidilserina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane, kao i kroz smanjen ulazak propidijum jodida u ćelije (Slika 16A). Antiapoptotski efekat C<sub>60</sub>SDS je ispitan i analizom ćelijskog ciklusa L929 ćelija koje su posle 24-časovnog tretmana SNP-om i fiksacije etanolom obojene propidijum jodidom. Citofluorimetrijskom analizom praćen je procenat ćelija u sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> frakciji, odnosno fragmentacija DNK koja karakteriše proces apoptoze. Rezultati su pokazali porast broja hipodiploidnih ćelija sa fragmentisanom DNK u prisustvu SNP (Slika 16B), dok je tretman sa C<sub>60</sub>SDS doveo do značajnog smanjenja sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> frakcije, čime je potvrđeno njegovo antiapoptotsko dejstvo (Slika 16B).



**Slika 16. C<sub>60</sub> nanočestice sprečavaju NO-om izazvanu apoptozu.** (A, B) Čelije su inkubirane sa 1 mM SNP, sa ili bez 50 µg/ml C<sub>60</sub>SDS. Eksternalizacija fosfatidilserina (A) i fragmentacija DNK (B) su utvrđene protočnom citofluorimetrijom. Prikazane su slike analize protočne citofluorimetrije iz reprezentativnog od najmanje tri eksperimenta.

#### 4.16 C<sub>60</sub>SDS smanjuje depolarizaciju mitohondrija izazvanu NO-om

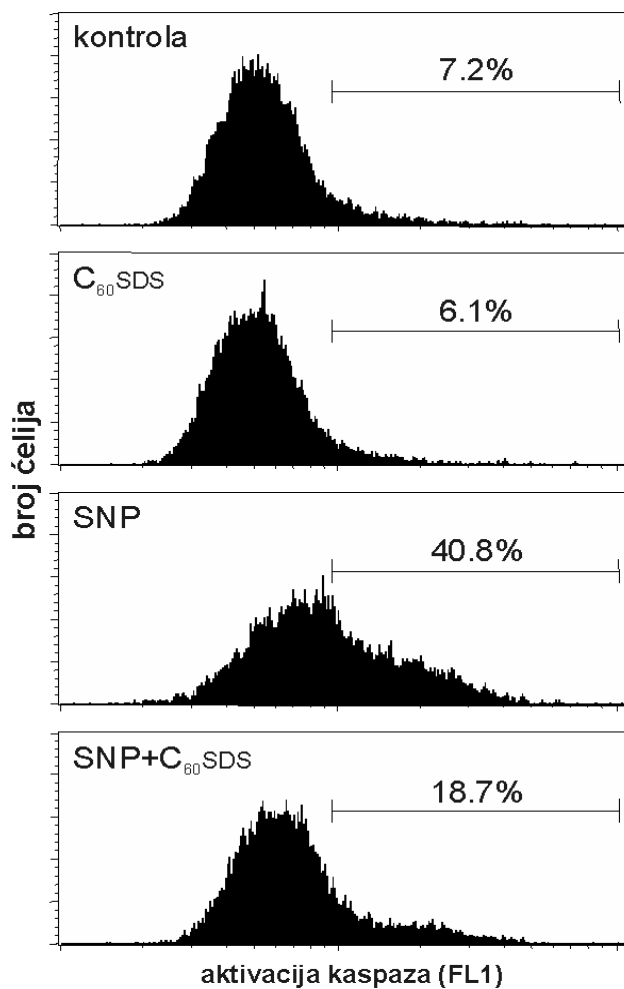
Nakon što je utvrđeno da mehanohemijski sintetisane C<sub>60</sub> nanočestice poseduju antiapoptotska svojstva, detaljnije su ispitani mehanizmi njihovog protektivnog dejstva. Depolarizacija mitohondrijalne membrane, koja je jedan od inicijalnih stadijuma indukcije apoptoze (Bonora i Pinton; Bonora i Pinton, 2014), detektovana je u SNP-om tretiranim L929 ćelijama, u kojima se jasno vidi smanjenje odnosa crvene (FL3) i zelene (FL1) fluorescence boje DePsipher koja se vezuje za mitohondrije (Slika 17). U prisustvu C<sub>60</sub>SDS, pad potencijala mitohondrijalne membrane je bio mnogo slabije izražen (Slika 17), što ukazuje na mogućnost da su upravo mitohondrije unutarćelijska meta citoprotektivnog dejstva fullerenskih nanočestica.



**Slika 17. C<sub>60</sub>SDS sprečava depolarizaciju mitohondrijske membrane indukovanu NO-om.** (A, B) L929 ćelije su tretirane sa 1 mM SNP, sa ili bez C<sub>60</sub>SDS (50 μg/ml). Protočnom citofluorimetrijom je utvrđena promena mitohondrijalnog membranskog potencijala. Prikazani su reprezentativni histogrami (A) iz najmanje tri eksperimenta, dok su rezultati (B) srednje vrednosti ± SD iz tri eksperimenta (\*p < 0.05 i #p < 0.05 su u odnosu na kontrolne ili SNP-om tretirane ćelije, respektivno).

#### 4.17. C<sub>60</sub>SDS smanjuje NO-om indukovanu aktivaciju kaspaza

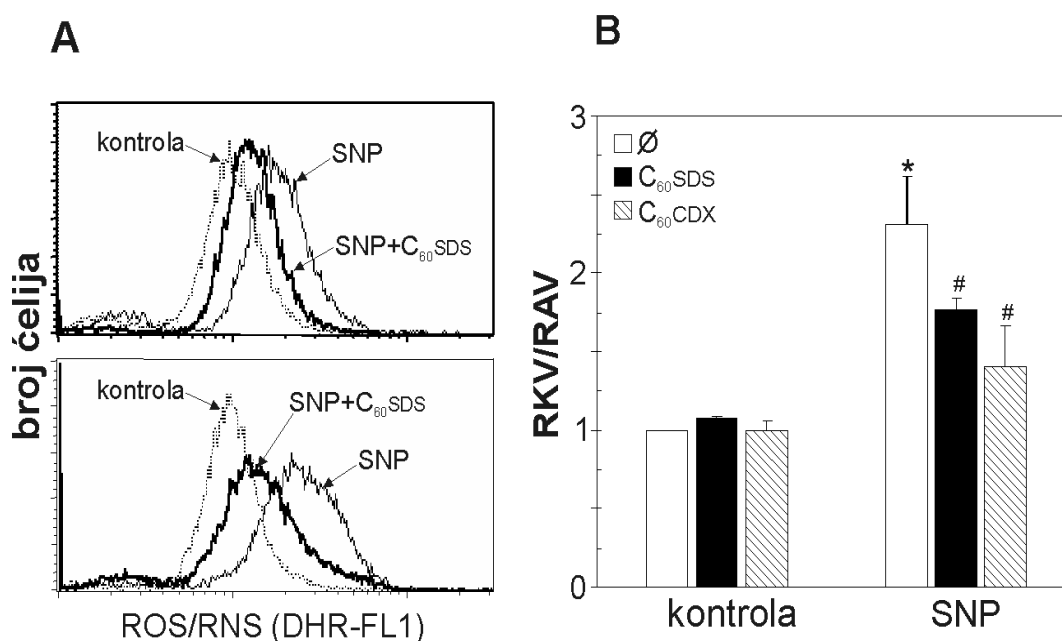
U narednim eksperimentima je ispitano da li fullerenske nanočestice utiču na apoptozu indukovanu NO-om tako što utiču na aktivaciju kaspaza. Kaspaze su intracelularni enzimi koji imaju važnu ulogu u procesu egzekucije apoptoze (Elmore, 2007). U L929 ćelijama tretiranim SNP-om došlo je do izraženog povećanja u aktivaciji kaspaza, što je potvrđeno povećanjem fluorescence Apostat-a, pankaspaznog inhibitora obeleženog fluorohromom FITC (Slika 18). Tretman ćelija sa C<sub>60</sub>SDS je značajno smanjio intenzitet fluorescence kaspaznog inhibitora, te je na taj način utvrđeno da C<sub>60</sub> nanočestice inhibiraju apoptozu indukovanu NO-om upravo inhibicijom aktivnosti kaspaza (Slika 18)



**Slika 18. C<sub>60</sub>SDS smanjuje aktivaciju kaspaza indukovanu NO-om (A)** L929 ćelije su inkubirane sa 1 mM SNP, sa ili bez 50 µg/ml C<sub>60</sub>SDS. Aktivacija kaspaza je ispitana korišćenjem protočne citofluorimetrije. Prikazani su reprezentativni histogrami iz najmanje tri eksperimenta

#### 4.18. Mehanohemijski pripremljeni fulereni smanjuju produkciju RKV i RAV u L929 ćelijama tretiranim SNP-om

Poznato je da je oksidativni stres snažan aktivator apoptotskih procesa u ćeliji (Buttke i Sandstrom, 1994). Nakon što je potvrđeno antiapoptotsko dejstvo C<sub>60</sub> nanočestica, ispitano je da li se taj efekat ispoljava upravo preko smanjenja koncentracije unutarćelijskih RKV i RAV. L929 ćelije su posle tretmana SNP-om obojene DHR-om, a zatim je izvršena citofluorimetrijska analiza. DHR je neselektivna, redoks-senzitivna fluorescentna boja koja je osetljiva na više reaktivnih molekula kao što su H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO i ONOO<sup>-</sup>, te je povećanje fluorescence ukazalo da NO oslobođen iz SNP-a dovodi do značajne akumulacije RKV i/ili RAV u tretiranim ćelijama (Slika 19). U tretmanu sa C<sub>60</sub>SDS i C<sub>60</sub>CDX nanočesticama došlo je do značajnog pada nivoa RKV/RAV u ćelijama tretiranim SNP-om (Slika 19), te je potvrđena pretpostavka da se citoprotektivno dejstvo fullerenskih nanočestica odvija delimično preko redukcije oksidativnog stresa.

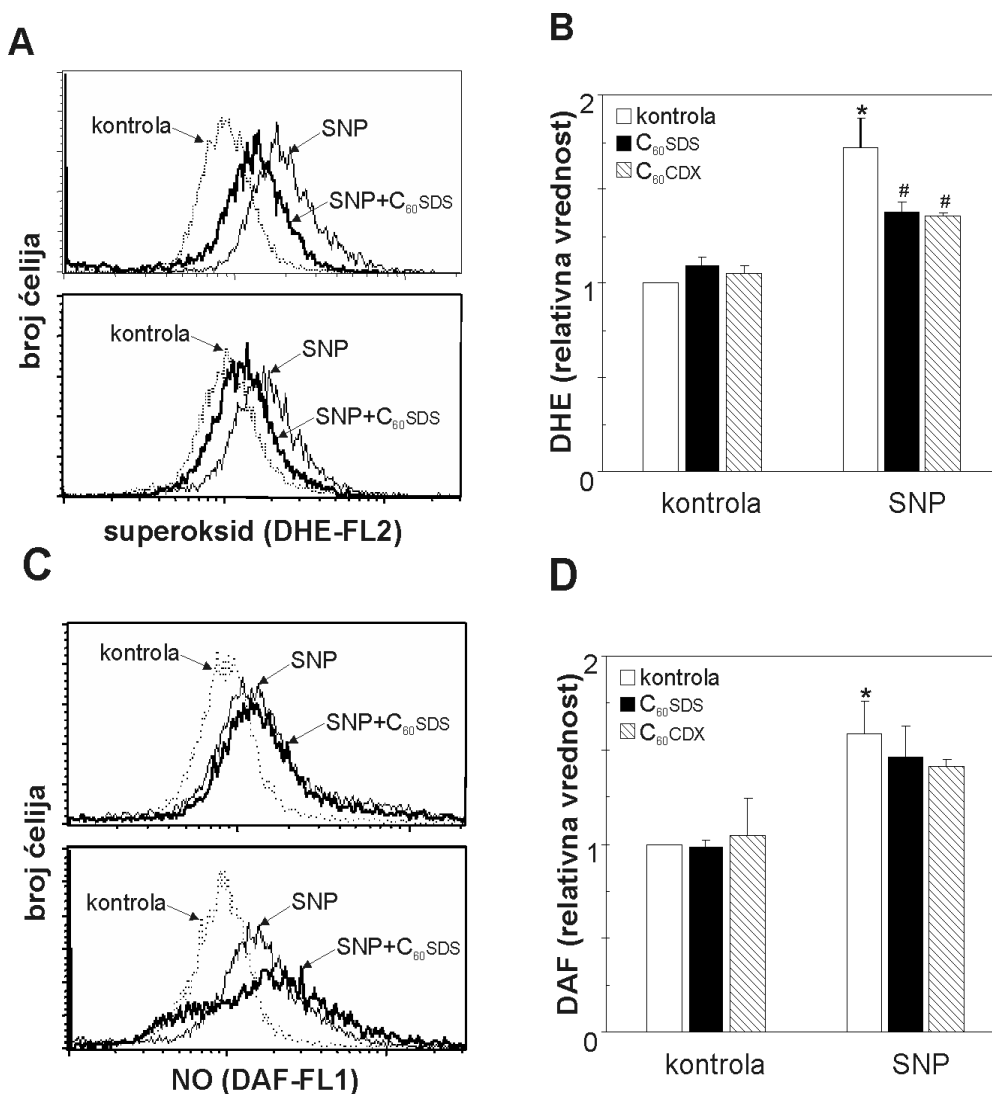


**Slika 19. Uticaj C<sub>60</sub> nanočestica na unutarćelijsku proizvodnju RKV i RAV.** (A, B) L929 ćelije su inkubirane sa 1 mM SNP, sa ili bez 50 µg/ml C<sub>60</sub>SDS ili C<sub>60</sub>CDX. Unutarćelijska produkcija totalnog RKV/RAV je utvrđena protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem DHR. Prikazani su reprezentativni histogrami, dok su rezultati (B) srednje vrednosti ± SD iz tri odvojena eksperimenta (\*p < 0.05 je u odnosu na netretirane kontrole, a #p < 0.05 na ćelije tretirane SNP-om)



#### 4.19. C<sub>60</sub>SDS i C<sub>60</sub>CDX smanjuju produkciju superoksid anjona indukovanu SNP-om

Da bi se preciznije definisali ciljni molekuli antioksidativnog dejstva C<sub>60</sub> nanočestica, upotrebene su dve selektivne fluorescentne boje: DAF i DHE.

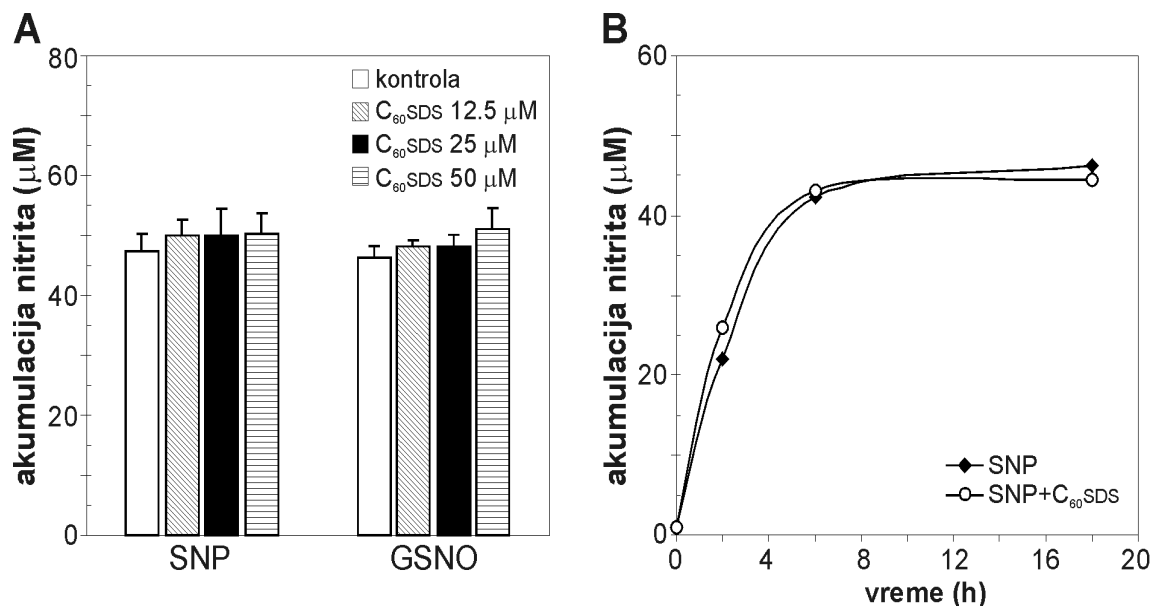


**Slika 20. Uticaj C<sub>60</sub> nanočestica na proizvodnju superoksid anjona i NO u ćelijama tretiranim SNP-om.** (A–D) L929 ćelije su inkubirane sa 1 mM SNP, u prisustvu ili odsustu C<sub>60</sub>SDS ili C<sub>60</sub>CDX (50 µg/ml). Unutarćelijska produkcija superoksid anjona (A, B) i NO (C, D) je ispitana korišćenjem protočne citofluorimetrije u ćelijama obojenim odgovarajućim reporter bojama (DHE za O<sub>2</sub> i DAF za NO). Prikazani su reprezentativni histogrami (A, C) dok su podaci u (B, D) srednje vrednosti ± SD iz tri eksperimenta (\*p < 0.05 i #p < 0.05 su u odnosu na netretirane kontrolne ćelije ili ćelije tretirane SNP-om, respektivno).

DAF je redoks senzitivna boja koja reaguje na azot-monoksid i peroksinitrit, dok DHE registruje superoksid anjon radikal (Cai, Dikalov i sar., 2007). U tretmanu L929 ćelija SNP-om došlo je do izrazitog povećanja fluorescence obe boje. Međutim, u ćelijama tretiranim sa C<sub>60</sub>SDS ili C<sub>60</sub>CDX došlo je samo do smanjenja SNP-om indukovane fluorescence DHE, dok je fluorescenca DAF-a ostala nepromenjena. Stoga se čini da je antioksidativno dejstvo C<sub>60</sub> nanočestica u ćelijama tretiranim SNP-om posledica smanjenja akumulacije superoksid radikala, ali ne i NO.

#### **4.20 C<sub>60</sub>SDS ne utiče na akumulacija nitrita u vodenom rastvoru SNP i GSNO**

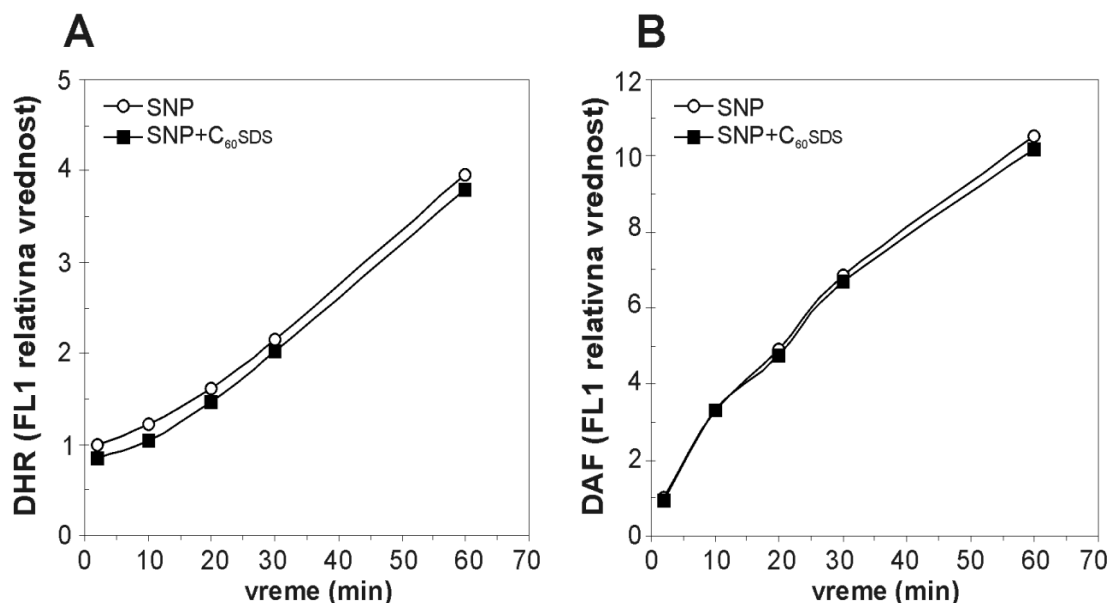
Superoksid anjon veoma lako reaguje sa NO-om dajući peroksinitrit (Pacher, Beckman i sar., 2007). To je jedan od načina na koji prisustvo ćelija može da utiče na detekciju koncentracije NO. Da bi se isključila ta mogućnost, ispitani su efekti C<sub>60</sub> nanočestica na koncentraciju NO u in vitro uslovima bez ćelija. NO donori SNP i GSNO su rastvoreni u medijumu za kultivaciju ćelija u prisustvu ili odsustvu C<sub>60</sub>SDS, a nakon 8 sati je merena koncentracija oslobođenog NO metodom po Grissu, koja zapravo meri koncentraciju nitrita u koje NO prelazi u vodenom rastvoru. Pokazano je da fullerenske nanočestice nisu značajno uticale na produkciju NO od strane NO donora (Slika 21A). Nesposobnost C<sub>60</sub>SDS da utiče na akumulaciju nitrita u rastvoru SNP potvrđena je i nakon različitih vremenskih intervala (Slika 21B). Ovi rezultati sugerišu da C<sub>60</sub>SDS ne utiče direktno na akumulaciju NO.



**Slika 21. Efekti C<sub>60</sub> nanočestica na akumulaciju nitrita u rastvoru NO donora.** (A,B) NO donori SNP (0.5 mM) i GSNO (1 mM) su rastvoreni u medijumu za kultivaciju ćelija, sa ili bez različitih koncentracija (A) ili 50 µg/ml C<sub>60</sub>SDS (B). Akumulacija nitrita, kao merilo koncentracije NO, utvrđena je posle 8 h (A) ili u naznačenim vremenskim intervalima (B). Prikazani podaci su srednja vrednost ± SD tripplikata iz reprezentativnog od najmanje tri eksperimenta (\*p < 0.05; SD vrednosti u B su bile < 5% srednje vrednosti).

#### 4.21 C<sub>60</sub>SDS ne utiče na koncentraciju NO u vodenom rastvoru SNP

Kao potvrda prethodnim rezultatima dobijenim merenjem nitrita, pokazano je da C<sub>60</sub>SDS ne utiče na povećanje fluorescence kako neselektivne boje DHR, tako i NO-selektivne boje DAF u SNP rastvoru (Slika 22A, B). Ovi podaci ukazuju na to da citoprotektivni efekat C<sub>60</sub>SDS ne zavisi od direktne neutralizacije NO molekula, nego verovatno od interakcije sa unutarćelijskim mehanizmima uključenim u indukciju apoptoze NO-om.

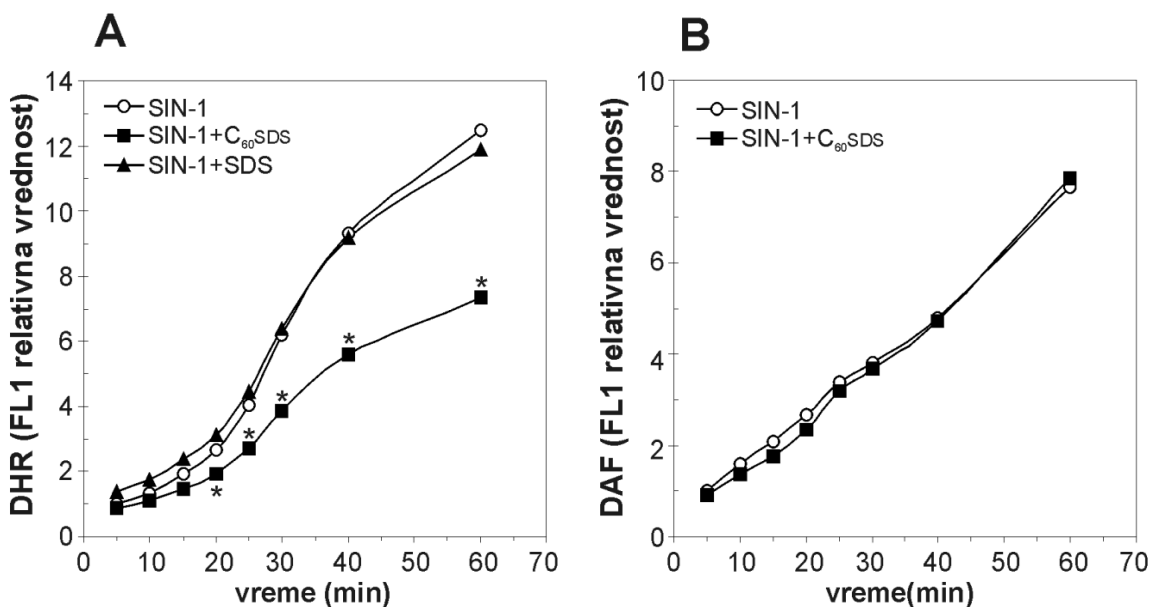


**Slika 22. Uticaj C<sub>60</sub>SDS na koncentraciju NO u rastvoru SNP.** (A, B) NO donor, SNP (0,5 mM) je rastvoren u fosfatnom puferu, sa ili bez C<sub>60</sub> nanočestica (50 µg/ml). Fluorescenca DHR kao mera totalne RKV/RAV proizvodnje (A) i fluorescenca NO-selektivne boje DAF (B) su merene u određenim vremenskim intervalima. Prikazani podaci su srednja vrednost ± SD triplikata iz reprezentativnog od najmanje tri eksperimenta (\*p < 0.05; SD vrednosti u B su bile < 5% srednje vrednosti).

#### 4.22 C<sub>60</sub>SDS smanjuje produkciju RKV i RAV u vodenom rastvoru SIN-1

U prethodnim eksperimentima (Slika 17) predložena je mogućnost da NO može da dovede do mitohondrijalne disfunkcije, a samim tim i do povećane produkcije superoksid radikala. U tom slučaju, moguće je da C<sub>60</sub> smanjuje ćelijsko oštećenje tako što dovodi do neutralizacije superoksida, a samim tim sprečava formiranje izuzetno reaktivnog peroksinitrita iz superoksida i azot monoksida. Da bi se ispitala ova pretpostavka, upotrebljen je SIN-1, donor peroksinitrita, koji u isto vreme oslobađa NO i superoksid radikal. Na ovaj način moguće je oponašati stanje unutar ćelije u kome NO indukuje oslobađanje superoksida iz mitohondrija. C<sub>60</sub>SDS, ali ne i sam SDS, doveo je do značajnog smanjenja fluorescence neselektivnog RKV/RAV senzora DHR u rastvoru

SIN-1 (Slika 23A). Ovaj podatak je u saglasnosti sa postavljenom hipotezom da C<sub>60</sub> može da inaktivira superoksid anjon. Sa druge strane, C<sub>60</sub>SDS nije uticao na SIN-om indukovanu fluorescencu DAF, NO/ONOO selektivnog senzora (Slika 23B). Sposobnost C<sub>60</sub> nanočestica da utiču na oksidaciju DHE, boje specifične za superoksid, nije ispitana u uslovima bez ćelija jer se njena fluorescence nije povećavala u prisustvu SIN. Razlog za to je verovatno činjenica da je za fluorescencu DHE potrebno prisustvo nekih ćelijskih elemenata, kao što je DNK (Zhao, Kalivendi i sar., 2003). U svakom slučaju, dobijeni podaci sugerišu da je protektivni efekat C<sub>60</sub>SDS nanočestica posledica inaktivacije superoksida i naknadne proizvodnje peroksinitrita, pre nego direktne neutralizacije NO ili peroksinitrita.

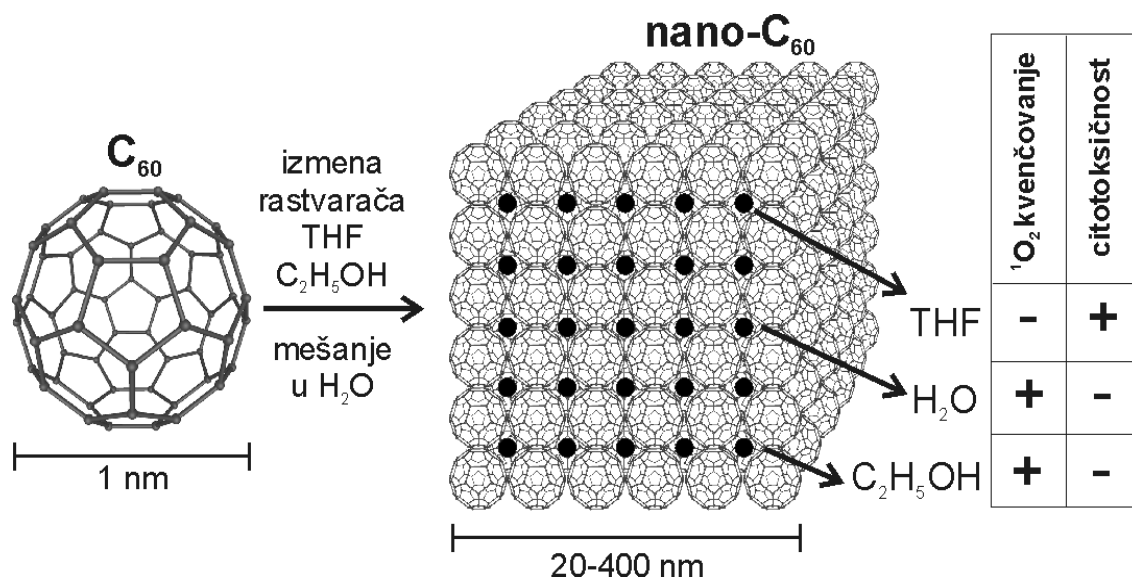


**Slika 23. Efekti C<sub>60</sub> nanočestica na produkciju RKV i RAV u rastvoru SIN-1.** (A, B) NO/superoksid donor SIN-1 (0.2 mM) je rastvoren u fosfatnom puferu, sa ili bez 50 µg/ml C<sub>60</sub>SDS (A, B) ili 6.25 µg/ml SDS (A). DHR i DAF fluorescencija je merena u određenim vremenskim intervalima. Dobijeni podaci su srednje vrednosti ± SD triplikata iz reprezentativnog od tri eksperimenta (\*p < 0.05; SD vrednosti su bile < 5% od srednje vrednosti).

## 5. DISKUSIJA

U ovoj studiji izvršeno je poređenje prooksidativnih, odnosno antioksidativnih efekata nederivatizovanih fullerenskih nanočestica pripremljenih različitim metodama, da bi se stekao bolji uvid u to koliko i na koji način priprema preparata menja svojstva i efekte fullerenskih nanočestica. Kod preparata proizvedenih metodom zamene rastvarača jasno je pokazano da sposobnost različitih koloidnih rastvora C<sub>60</sub> da proizvode RKV i ubijaju ćelije zavisi od rastvarača koji se koristi za njihovu pripremu. S obzirom na sposobnost da generišu RKV i izazovu mitohondrijalnu disfunkciju i nekrozu, različiti C<sub>60</sub> preparati su rangirani na sledeći način: THF/nC<sub>60</sub> > EtOH/nC<sub>60</sub> > H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub>. Da bi se eliminisala mogućnost da utvrđene razlike u citotoksičnosti nC<sub>60</sub> zavise od vrste organizma iz koga ćelije potiču, tipa ćelija ili metodologije koja se koristi za utvrđivanje ćelijske smrti, korišćene su različite tumorske ćelijske linije i primarne ćelije koje potiču od čoveka, pacova i miša, kao i nekoliko različitih testova ćelijskog vijabiliteta. Što se tiče tipa ćelija, humani keratinociti su korišćeni jer se fulereni već koriste u preparatima za negu kože (Lens, 2009). Iako se MTT test rutinski koristi za utvrđivanje ćelijske smrti, nedavno je objavljeno da ugljenične nanotube mogu direktno da utiču na redukciju MTT u odsustvu ćelija (Worle-Knirsch, Pulskamp i sar., 2006), stoga izazivajući sumnju u ispravnost korišćenja MTT eseja u testiranju ćelijskog preživljavanja pri tretmanu sa ugljeničnim nanomaterijalima. Međutim, s obzirom na to da je sličan rezultat dobijen korišćenjem mikroskopije za morfološka ispitivanja, kristal violet testa za utvrđivanje broja ćelija, citofluorimetrijske analize integriteta ćelijske membrane i MTT testa za mitohondrijalnu aktivnost, čini se da je MTT dovoljno precizan za ispitivanje citotoksičnosti nC<sub>60</sub>. Takođe su potvrđeni već poznati podaci da THF/nC<sub>60</sub> uglavnom izaziva nekrozu (Isakovic, Markovic i sar., 2006), tip ćelijske smrti za koju je karakteristično oštećenje ćelijske membrane, a ne apoptozu, programiranu ćelijsku smrt u kojoj ćelijska membrana ostaje intaktna, dok je DNK fragmentisana (Edinger i Thompson, 2004).

Već je poznato da otvaranje MPT pore kod pada potencijala mitohondrijalne membrane može da igra centralnu ulogu u nekim oblicima nekroze izazvane oksidativnim stresom (Lemasters, Nieminen i sar., 1998). Upotrebom fluocitometrijskih analiza je pokazano da tretman ćelija sa THF/nC<sub>60</sub> dovodi do značajnog pada membranskog potencijala mitohondrija. Dakle, mitohondrijalna depolarizacija i posledično otvaranje MPT pore mogli bi da doprinesu oštećenju ćelijske membrane (Sayes, Gobin i sar., 2005) i posledičnoj nekrozi izazvanoj THF/nC<sub>60</sub> nanočesticama. Imajući u vidu činjenicu da RKV značajno doprinosi citotoksičnosti THF/nC<sub>60</sub> (Sayes, Gobin i sar., 2005; Isakovic, Markovic i sar., 2006), rezultati eksperimentalne analize proizvodnje RKV od strane tri različita preparata nC<sub>60</sub> su dobro korelisali sa njihovom citotoksičnošću u smislu da je THF/nC<sub>60</sub> bio mnogo efikasniji u generisanju RKV nego EtOH/nC<sub>60</sub> ili H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub>. Interesantno je i to da je H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> izazvao nizak nivo nekroze, što je potvrđeno i MTT testom, iako nije doveo do nastanka RKV. Ovo je u skladu sa podacima o genotoksičnosti H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> i EtOH/nC<sub>60</sub> (Dhawan, Taurozzi i sar., 2006), i ukazuje na mogućnost da je citotoksičnost nC<sub>60</sub> delimično nezavisna od koncentracije RKV. U skladu sa takvom pretpostavkom su i podaci o nemogućnosti antioksidanata da u potpunosti dovedu do oporavka ćelija tretiranih sa THF/nC<sub>60</sub>. Podaci dobijeni EPR analizom, zajedno sa eksperimentima u kojima su korišćeni agensi koji neutrališu singlet kiseonik, po prvi put su pokazali da u vodenom rastvoru THF/nC<sub>60</sub> dolazi do nastanka singlet kiseonika. Matematički model produkcije singlet kiseonika ukazuje na to da kapacitet nC<sub>60</sub> da generiše RKV prvenstveno zavisi od sposobnosti rastvarača, uz čije prisustvo je napravljen, da neutrališe singlet kiseonik. Stoga bi ekstremna citotoksičnost nanokristala impregniranog THF-om mogla da bude objašnjena skoro potpunom transformacijom kiseonika u visoko reaktivni singlet kiseonik. U skladu sa tim, nizak stepen produkcije RKV, a samim tim i skoro zanemarljiva citotoksičnost EtOH/nC<sub>60</sub> i H<sub>2</sub>O/nC<sub>60</sub> bi mogla da bude pripisana veoma visokom stepenu eliminacije singlet kiseonika od strane etanola i vode.



Slika 24. Shematski prikaz uticaja sposobnosti rastvarača da priguši  $^1\text{O}_2$ , na citotoksičnost  $n\text{C}_{60}$ .

Treba naglasiti da je reaktivnost DHR i  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , nespecifičnih RKV-senzitivnih fluorescentnih boja, ukazala na to da i superoksid anjon, hidroksil radikal i vodonik peroksid mogu da budu generisani u vodenom rastvoru THF/ $n\text{C}_{60}$ . Sayes i saradnici su već pokazali da  $n\text{C}_{60}$  proizvodi superoksid, korišćenjem jodofenola i ksantina, fluorescentnih boja osetljivih na superoksid. Iako je ovo u skladu sa pokazanom sposobnošću  $\text{C}_{60}$  rastvorenih uz pomoć deterdženta da generišu i superoksid i hidroksil radikal u vodenim rastvorima (Yamakoshi, Umezawa i sar., 2003), potrebna su dodatna ispitivanja uloge  $n\text{C}_{60}$  u produkciji različitih kiseoničnih vrsta.

Naši eksperimentalni podaci su takođe pokazali da rastvor fulerenskih nanočestica izložen gama zračenju gubi sposobnost da izazove nekrotičnu ćelijsku smrt indukovanu povećanom produkcijom RKV i, upravo suprotno, dobija sposobnost da štiti ćelije od oksidativnog stresa. Promene u fizičko-hemijskim osobinama nanočestica koje se nalaze u osnovi primećenih bioloških efekata verovatno uključuju razgradnju THF kao i derivatizaciju površine nanočestica. U skladu sa podacima dobijenim sa čistim, praškastim  $\text{C}_{60}$  (Albarrán, Basiuk i sar., 2004), fulerenski kavez THF/ $n\text{C}_{60}$  ostaje netaknut posle izlaganja gama zracima. Sa druge strane, THF umetnut unutar nanokristala biva u većoj meri razgrađen, što se vidi po pojavljivanju anhidridnih grupa u FTIR spektroskopskim analizama. Uz to, primećen je porast u veličini ozračenih



nanočestica što ukazuje na moguće kovalentno vezivanje anhidridnih ostataka za fullerenski kavez. Pretpostavka je da kada bi se na stranicu nC<sub>60</sub> kristalne kocke dodale samo dve dužine linearnog anhidrida dobila bi se vrednost od 33.6 nm koja je veoma slična veličini ozračene nanokocke od 35.2 nm (mereno DLS-om). Moguće je da tokom ozračivanja dolazi i do dodatne derivatizacije nC<sub>60</sub> jer je poznato da tokom gama radiolize vode i THF dolazi do stvaranja većih količina različitih slobodnih radikala (Baxendale, Beaumont i sar., 1970; Draganic, 1971). Ugradnja atoma kiseonika u karbonil ili hidroksi grupama je pokazana kod gama ozračenog vlažnog praškastog C<sub>60</sub> (Albarrán, Basiuk i sar., 2004), što bi moglo da potvrdi hipotezu da gama zračenje može da izazove derivatizaciju molekula fulerena na površini nanokristala.

Rezultati ove disertacije pokazuju da su promene u fizičko-hemijskim osobinama THF/nC<sub>60</sub> izloženog gama zračenju povezane sa nemogućnošću da generiše RKV i izazove lipidnu peroksidaciju i ćelijsku smrt. Ovo je u skladu sa prethodno objavljenim podacima da je toksičnost THF/nC<sub>60</sub> posredovana lipidnom peroksidacijom ćelijske membrane, što dovodi do narušavanja integriteta ćelijske membrane (Sayes, Fortner i sar., 2004; Sayes, Gobin i sar., 2005) i nekrotične ćelijske smrti (Isakovic, Markovic i sar., 2006). Ovo bi moglo da bude važno za razvijanje nC<sub>60</sub> kao antitumorskog agensa jer se smatra da je nekroza zbog svojih imunostimulišućih aktivnosti možda efikasnija od apoptoze u indukciji regresije tumora (Edinger i Thompson, 2004). Postoje kontroverzna stanovišta u vezi uloge organskog rastvarača u citotoksičnosti THF/nC<sub>60</sub> i ekotoksikološkog aspekta upotrebe nC<sub>60</sub>. Na osnovu zapažanja da se nastanak RKV i citotoksičnost smanjuju sa derivatizacijom fullerenskog kaveza, Sayes i saradnici su predložili da čist C<sub>60</sub> (THF/nC<sub>60</sub>), nasuprot derivatizovanom, može da bude citotoksičan (Sayes, Gobin i sar., 2005). Fizičko-hemijska karakterizacija  $\gamma$ /nC<sub>60</sub> je u skladu sa tim rezultatima jer pokazuje da bi nesposobnost  $\gamma$ /nC<sub>60</sub> da generiše RKV i samim tim da ubije ćelije mogla da bude posledica  $\gamma$ -zračenjem indukovane derivatizacije fullerenskih molekula na površini C<sub>60</sub> nanokristala. Sa druge strane, veoma slab toksični efekat koji izazivaju nC<sub>60</sub> dobijeni dugotrajnim mešanjem u vodi (Oberdörster, Zhu i sar., 2006) i *in vivo* citoprotektivni efekat C<sub>60</sub> rastvorenih korišćenjem deterdženta (Gharbi, Pressac i sar., 2005) daju argument da toksičnost THF/nC<sub>60</sub> uglavnom zavisi od toksičnosti rastvarača ugrađenog u njegove slojeve, dok je čist C<sub>60</sub> netoksičan odnosno citoprotektivan (Andrievsky, Kosevich i sar., 1995). U tom slučaju, gubitak

citotoksičnosti THF/nC<sub>60</sub> posle  $\gamma$ -zračenja bi mogao da bude rezultat inaktivacije toksičnosti THF kao posledica njegove razgradnje, što je pokazano karakterizacijom - ozračenog nC<sub>60</sub>, što bi nametnulo ideju o ekotoksikološkoj neprikladnosti upotrebe THF. Međutim, sam THF nije toksičan jer ne proizvodi RKV (Sayes, Fortner i sar., 2004) i ne utiče na vijabilitet ćelija ni u sto puta većim koncentracijama (Isakovic, Markovic i sar., 2006) od koncentracije u kojoj se nalazi, kako se pretpostavlja, u sastavu nanokristala nC<sub>60</sub> (Sayes, Gobin i sar., 2005). Dakle, da bi se THF-u pripisala toksičnost THF/nC<sub>60</sub>, mora se pretpostaviti neka vrsta sinergističke interakcije između C<sub>60</sub> i organskog rastvarača koja vodi do stvaranja RKV i posledične citotoksičnosti. Na primer, nedavno opisana sposobnost THF da negativno naelektriše površinu nC<sub>60</sub> kristala kroz prenos naelektrisanja (Sayes, Fortner i sar., 2004; Brant, Lecoanet i sar., 2005) bi mogla na neki način da utiče na kapacitet nC<sub>60</sub> da u interakciji sa vodom formira kiseonične radikale. Ova studija, dakle, daje alternativno objašnjenje za donekle uprošćena gledišta da sposobnost fullerenskih nanočestica da proizvode RKV i indukuju ćelijsku smrt u potpunosti zavisi od rastvarača (THF) koji se koristi za pripremu ili da uopšte ne zavisi od njega (Andrievsky, Kosevich i sar., 1995; Sayes, Fortner i sar., 2004).

Još jedan važan faktor u pripremi fullerenskih nanočestica je vidljiva svetlost. Zanimljivo je da iako nismo namerno izložili svetlu ni vodeni rastvor nC<sub>60</sub> ni ćelije tretirane nanočesticama, čini se da čak i minimalno izlaganje svetlu tokom pripreme rastvora, tretmana ćelija i posmatranja ćelija invertnim mikroskopom može da inicira nastanak RKV u našim eksperimentima. Iz tog razloga smo u matematičkom modelu koristili vrednost intenziteta zračenja (20 mW/cm<sup>2</sup>) koja približno odgovara ambijentalnom svetlu u laboratoriji. U skladu sa našim zapažanjima su i ranije zabeleženi podaci da dodatno izlaganje vidljivom svetlu ne može da poveća sposobnost nC<sub>60</sub> da proizvodi RKV (Sayes, Fortner i sar., 2004). Ovi rezultati ukazuju na postojanje razlike u fotofizičkim osobinama nC<sub>60</sub> i molekula C<sub>60</sub>, ali uzroci te pojave su još uvek nepoznati. Takođe, rezultati DLS merenja pokazuju da kristali THF/nC<sub>60</sub>, koji imaju najveći kapacitet u proizvodnji reaktivnih kiseoničkih vrsta, imaju najmanje dimenzije od ispitivanih preparata. Međutim, s obzirom na to da razlike u veličinama nisu jako izražene, malo je verovatno da je razlika u odnosu površina-zapremina ključna u određivanju sposobnosti nC<sub>60</sub> da proizvede RKV. To se dodatno potvrđuje redosledom

RKV proizvodnje ( $\text{THF/nC}_{60} > \text{EtOH/nC}_{60} > \text{H}_2\text{O/nC}_{60}$ ) i redosledom odnosa površina-zapremine ( $\text{THF/nC}_{60} < \text{H}_2\text{O/nC}_{60} < \text{EtOH/nC}_{60}$ ), koji se ne podudaraju. Naši eksperimentalni podaci i matematičko modelovanje ukazuju na to da rastvarač zaostao u nanokristalu ne doprinosi direktno sintezi reaktivnih kiseoničkih vrsta, već da pre uslovljava taj proces i tako doprinosi nekrotičnom oštećenju ćelija. Rezultati ove disertacije preispituju upotrebu THF u pripremi nanočestica, ali i upućuju na oprez u vezi niske toksičnosti čistog  $\text{C}_{60}$  rastvorenog u vodi. To ne podrazumeva i opasnost od potencijalne ekotoksičnosti THF/ $\text{nC}_{60}$ , jer je teško zamisliti uslove koji bi trebalo da se ispune da THF/ $\text{nC}_{60}$  slučajno bude generisan u prirodi u vodenom ekosistemu. Takođe, nasuprot *in vitro* podacima koji su rezultat eksperimenata ove disertacije, nalaze se rezultati studije u kojoj je pacovima intratrahealno dat THF/ $\text{nC}_{60}$  koji nije pokazao značajnije toksične efekte na plućima (Sayes, Marchione i sar., 2007). Kompleksnost pripreme i raznovrsnost mogućih efekata u zavisnosti od uslova aplikacije daje izuzetan značaj definisanju osnovnih mehanizama citotoksičnosti različitih koloidalnih preparata  $\text{C}_{60}$  i daje smernice za njihov razvoj u različite biomedicinske svrhe, uključujući terapiju tumora.

Drugi deo ove disertacije bavi se analizom strukturnih karakteristika, kao i redoks efekata mehanohemijski pripremljenih kompleksa  $\text{C}_{60}$  sa različitim molekulima (SDS,  $\gamma$ -ciklodekstrin i EVA-EVV). Za ovako pripremljene  $\text{nC}_{60}$ , za razliku od fullerenskih nanočestica pripremljenih metodom izmene rastvarača, već je pokazano da poseduju antioksidativna svojstva (Takada, Kokubo i sar., 2006). Rezultati ove disertacije pokazali su da mehanohemijski sintetisan  $\text{nC}_{60}$  može da zaštiti ćelije sisara od smrti indukovane NO-om, važnim biološkim slobodnim radikalom koji dovodi do oštećenja ćelija u različitim inflamatornim i degenerativnim bolestima (Thippeswamy, McKay i sar., 2006). Ovaj citoprotektivni efekat nije isključivo vezan za L929 ćelije mišjeg fibrosarkoma, već su slični efekti dobijeni i u C6 i U251 glijalnim ćelijskim linijama, što je posebno značajno zbog poznatih negativnih efekata NO-om indukovano oksidativnog stresa na ćelije nervnog sistema. Dok je za polihidroksilovane fulerene derivatizovane malonskom kiselinom već pokazano da inhibiraju aktivnost NO sintaze i imaju sposobnost da neutrališu NO (Wolff, Papoiu i sar., 2000; Mirkov, Djordjevic i sar., 2004), rezultati ove studije po prvi put opisuju mehanizme kojim mehanohemijski pripremljene  $\text{C}_{60}$  nanočestice neutralizuju

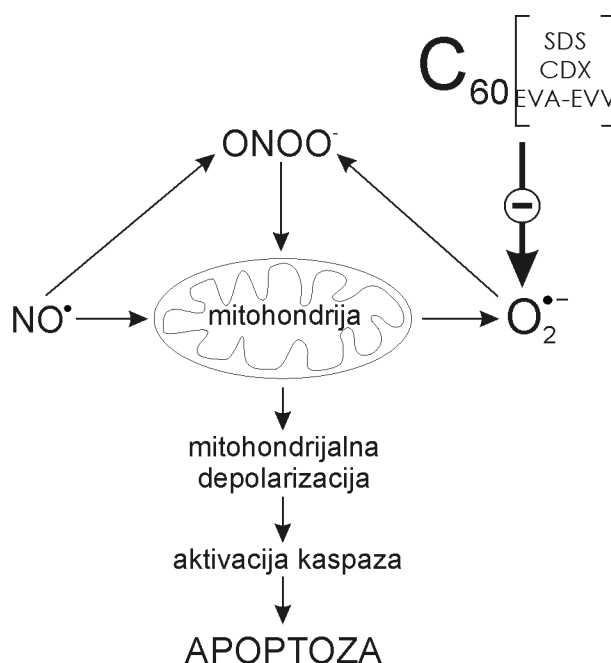
citotoksičnost izazvanu NO-om. Naši podaci ukazuju da C<sub>60</sub> nanočestice mogu da neutrališu superoksid koji proizvode mitohondrije i da na taj način spreče mitohondrijalno oštećenje i posledičnu inicijaciju apoptoze posredovane kaspazama. Prethodne studije su pokazale da mehanizmi odgovorni za citotoksičnost najverovatnije uključuju depolarizaciju mitohondrijalne membrane, otvaranje MPT pore i oslobađanje citohroma c koji dovodi do aktivacije kaspaza (Hortelano, Dallaporta i sar., 1997; Ushmorov, Ratter i sar., 1999; Bal-Price i Brown, 2000). Rezultati dobijeni u ovoj studiji podržavaju ove podatke pokazujući da je pojava osnovnih markera apoptoze kao što su aktivacija kaspaza, premeštanje fosfatidilserina na spoljašnost ćelijske membrane i fragmentacija DNK, usledila tek nakon pada mitohondrijalnog membranskog potencijala ćelija tretiranih NO-om. Uz to, osim što su blokirale NO-om indukovanu aktivaciju kaspaza i posledičnu apoptotsku fragmentaciju DNK, fulerenske nanočestice su dovele i do delimičnog oporavka mitohondrijalnog membranskog potencijala. Zbog toga se čini da su mitohondrije glavna meta C<sub>60</sub> nanočestica i da prevencija mitohondrijalne disfunkcije predstavlja mehanizam njihovog protektivnog dejstva u apoptozi izazvanoj NO-om. U skladu sa takvom pretpostavkom bi bili i rezultati teorijskih i eksperimentalnih studija koji predlažu mogućnost da C<sub>60</sub> nanočestice i njihovi derivati mogu da prođu kroz ćelijsku membranu i prodru do različitih unutarćelijskih struktura, uključujući mitohondrije (Foley, Crowley i sar., 2002; Porter, Muller i sar., 2006; Qiao, Roberts i sar., 2007). Rezultati ove disertacije, koji pokazuju porast ćelijske granuliranosti posle inkubiranja sa nanočesticama, takođe ukazuju na sposobnost mehanohemijski pripremljenih suspenzija nC<sub>60</sub> da prodru u intracelularni prostor.

NO dovodi do oštećenja mitohondrija, usled čega se povećava produkcija superoksida koji reaguje sa NO-om i tako nastaje izuzetno reaktivan peroksinitrit. Ovaj proces dodatno oštećuje mitohondrije i indukuje oksidativni stres koji vremenom dovodi do indukcije apoptotske ćelijske smrti (Keller, Kindy i sar., 1998; Ghafourifar, Schenk i sar., 1999). Protektivni efekat C<sub>60</sub> nanočestica, na osnovu rezultata ove studije, je posledica neutralizacije superoksida proizvedenog u mitohondrijama, pre nego direktne interakcije sa NO-om. Ovakvu hipotezu podržavaju eksperimenti sa fluoroforima koje reaguju sa različitim reaktivnim kiseoničnim i azotnim radikalima, čime je pokazano da su i C<sub>60</sub>SDS i C<sub>60</sub>CDX sposobni da snize nivo intracelularnog, kao

i hemijski generisanog superoksid anjona. To je u skladu sa već poznatom činjenicom da su  $C_{60}$  nanočestice, rastvorene uz korišćenje polivinilpirolidona ili ciklodekstrina, sposobne da efikasno vežu  $O_2^-$  i  $OH^-$  u sistemu bez ćelija (Ghafourifar, Schenk i sar., 1999; Xiao, Takada i sar., 2005). Pretpostavljena neutralizacija superoksid anjona od strane  $C_{60}$  nanočestica u ćelijama tretiranim NO-om verovatno sprečava njegovu reakciju sa  $O_2^-$  i posledično stvaranje visoko reaktivnog peroksinitrita. Sa druge strane,  $C_{60}$  nanočestice nisu direktno reagovala ni sa unutarćelijskim NO-om, ni sa NO-om kao proizvodom NO donora u rastvoru bez ćelija. S obzirom na to da ovi podaci direktno protivreče saznanjima o tome da polihidroksilovane fullerenske nanočestice vezuju i neutrališu NO (Mirkov, Djordjevic i sar., 2004), razlika u ponašanju mehanohemijski rastvorenog  $C_{60}$  u našim eksperimentalnim uslovima ostaje da bude razjašnjena. To istovremeno upućuje na moguće razlike u antioksidativnim svojstvima derivatizovanih fulerena u odnosu na fulerene čija struktura ostaje nepromenjena tokom pripreme.

Iako naši podaci potvrđuju antioksidativnu sposobnost različitih  $C_{60}$  preparata, precizno objašnjenje mehanizama koji stoje iza neutralizacije RKV fullerenskim nanočesticama nedostaje u ovom trenutku. Iako je pokazano da i do 34 benzil radikala može da bude neutralisano u dodiru sa fullerenskim kavezom (Krusic, Wasserman i sar., 1991), direktna interakcija sa RKV još uvek nije dokazana (Markovic i Trajkovic, 2008). Interesantno je da  $C_{60}$  derivatizovani malonskom kiselinom ne uklanjaju  $O_2^-$  stohiometrijskim vezivanjem kao što bi se očekivalo, nego kroz katalitičku dismutaciju superoksida u kojoj regioni fulerena  $C_{60}$  deficitarni elektronima sarađuju sa vezanim malonskim grupama u sprovođenju i stabilizaciji superoksida (Ali, Hardt i sar., 2004). U skladu sa tim, mogla bi da se pretpostavi neka vrsta kooperacije između  $C_{60}$  i molekula korišćenih za mehanohemijsku pripremu  $nC_{60}$  da bi se objasnila neutralizacija RKV u našim eksperimentima. To bi bilo u skladu sa već pokazanom relativno visokom sposobnošću SDS i CDX za neutralizaciju RKV (podaci iz Centralne baze podataka za radijacionu hemiju laboratorije Notr Dam), kao i sa saznanjem da značajnu ulogu u neutralizaciji  $OH^-$ , u slučaju kompleksa CDX- $C_{60}$ , igra makromolekularni domaćin, odnosno CDX (Guldi i Asmus, 1999). U našim eksperimentalnim uslovima sam SDS, u odgovarajućim koncentracijama, nije bio u stanju da dostigne nivo RKV/RAV neutralizacije koji je postignut korišćenjem  $C_{60}$  nanočestica, a samim tim ni da dovede do spasavanja ćelija od ćelijske smrti izazvane oksidativnim stresom, potvrđujući

zaključak da sam molekul domaćin nije odgovoran za citoprotektivni efekat mehanohemijski pripremljenih nanočestica. Dok UV-vis analize pokazuju da  $C_{60}$  nije hemijski modifikovan u kompleksu sa CDX ili EVA-EVV, u slučaju molekulskih kompleksa sa SDS dolazi do gubitka tipičnih UV apsorpcionih vrhova za fuleren  $C_{60}$ , što sugeriše hemijsku reakciju između SDS i fulerena. Ako se pretpostavi da alkilni ostatak surfaktanta leži na površini fullerenskog kaveza onda je energetski povoljno da se lanci saviju oko kaveza kada su pripijeni uz površinu fulerena malog prečnika. Na ovaj način se uspostavljaju Van der Valsove interakcije između alkilnih ostataka i površine fulerena, dok je jonski deo surfaktanta u kontaktu sa vodom. Sličan model je bio predložen za nanotube obavijene SDS-om i rastvorene u vodi (Islam, Rojas i sar., 2003).



**Slika 25. Shema delovanja mehanohemijski pripremljenih  $nC_{60}$  u ćeliji**

Rezultati ove disertacije opisuju sposobnost mehanohemijski sintetisanih  $nC_{60}$  da štite ćelije sisara od *in vitro* toksičnosti NO, biološki izuzetno značajnog slobodnog radikala. Citoprotektivno dejstvo  $C_{60}$  nanočestica nije posredovano direktnom interakcijom sa NO-om nego neutralizacijom superoksid anjon radikala poreklom iz mitohondrija. Nastanak peroksinitrita i posledična mitohondrijalna depolarizacija, aktivacija kaspaza i apoptotska ćelijska smrt, smanjene su u ćelijama tretiranim fullerenskim nanočesticama

kao posledica inaktivacije NO-om indukovane produkcije superoksid radikala. U svetlu poznate uloge NO u izazivanju oštećenja tkiva tokom zapaljenskih i degenerativnih procesa (Thippeswamy, McKay i sar., 2006) naša saznanja otvaraju mogućnost ispitivanja kompleksa  $C_{60}$  i odgovarajućih molekula domaćina kao potencijalnih terapeutika u bolestima koje se odlikuju visokom produkcijom ovog azotnog slobodnog radikala.

Bez obzira na velike napore da se fulereni uvedu u terapiju humanih oboljenja i velikog broja studija koje se bave potencijalnom primenom fulerena u biomedicini, njihov razvoj kao terapijskih i dijagnostičkih agenasa je još u začetku. Jedan od glavnih razloga za to je nedostatak metoda za kontrolisanu masovnu sintezu dovoljno prečišćenih preparata za farmaceutsku primenu. Problem je delimično i u našem nedovoljnom razumevanju odnosa između struktura i bioloških efekata fulerenskih preparata, s obzirom na čitav niz modifikacija potrebnih da bi se fulereni rastvorili u vodi. Na sposobnost da generiše ili neutrališe RKV utiče kovalentno vezivanje funkcionalnih grupa za fulerensko jezgro, kao i fizičko-hemijske promene do kojih dolazi usled procedura za rastvaranje neophodnih za pripremu preparata fulerenskih nanočestica. Različiti rastvarači značajno utiču na sposobnost nanočestica da proizvide ili neutrališu RKV, ili direktno, sposobnošću da sami neutrališu slobodne radikale, ili indirektno, tako što određuju veličinu površine nanočestice, njene hemijske osobine, kao i stepen aglomeracije. Šta više, kapacitet za produkciju ili neutralizaciju RKV se u nekim slučajevima sinergistički povećava kao rezultat neuobičajenih interakcija fulerena sa molekulima korišćenim za pripremu fulerenskih nanočestica. Interakcija sa rastvaračima kao što je THF dovodi do visoke citotoksičnosti fulerenskih nanočestica dok primena surfaktanata i polimera u proizvodnji  $nC_{60}$  omogućava njihovu citoprotektivnu aktivnost. Ove kompleksne osobine preparata  $C_{60}$  omogućuju raznovrsne biološke efekte koji su zatim dodatno modifikovani intenzitetom ugradnje u ćelijsku membranu, ćelijskom internalizacijom i lokalizacijom u različitim ćelijskim odeljcima. Rezultati ove disertacije ukazuju na značaj ispitivanja ovih odnosa i bioloških efekata koji zavise od RKV, jer je to osnovni preduslov za razvoj fulerena kao potencijalnih lekova.

## 6. ZAKLJUČCI

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

- Sposobnost fullerenskih nanočestica da proizvode RKV i izazovu citotoksičnost zavisi od rastvarača. Upotreba THF, ali ne etanola ili vode, dovodi do nastanka citotoksičnih C<sub>60</sub> nanočestica koje proizvode RKV.
- Oksidativni stres izazvan THF/nC<sub>60</sub> nanočesticama prouzrokuje pad membranskog potencijala mitohondrija, oštećenje ćelijske membrane i nekrotičnu ćelijsku smrt. Citotoksičnost THF/nC<sub>60</sub> ne zavisi direktno od THF ugrađenog u fullerenske nanokristale, već je uslovljena njegovim permisivnim uticajem na citotoksičnu produkciju RKV od strane C<sub>60</sub>.
- Za razliku od THF/nC<sub>60</sub>, mehanohemijski pripremljeni nanokompleksi C<sub>60</sub> sa različitim molekulima nisu citotoksični, već pokazuju citoprotektivno dejstvo u apoptotskoj smrti izazvanoj NO-om, jednim od najznačajnijih bioloških slobodnih radikala.
- Citoprotektivno dejstvo mehanohemijski pripremljenih nC<sub>60</sub> ne zavisi od direktne interakcije sa NO-om, nego od neutralizacije NO-om indukovane produkcije superoksida anjon radikala u mitohondrijama.



## 7. LITERATURA

- Albarrán, G., V. A. Basiuk, et al. (2004). "Stability of interstellar fullerenes under high-dose  $\gamma$ -irradiation." Advances in Space Research **33**(1): 72-75.
- Ali, S. S., J. I. Hardt, et al. (2004). "A biologically effective fullerene (C60) derivative with superoxide dismutase mimetic properties." Free Radic Biol Med **37**(8): 1191-1202.
- Andrievsky, G. V., M. V. Kosevich, et al. (1995). "On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes." Journal of the Chemical Society, Chemical Communications(12): 1281-1282.
- Arbogast, J. W., A. P. Darmanyan, et al. (1991). "Photophysical properties of sixty atom carbon molecule (C60)." The Journal of Physical Chemistry **95**(1): 11-12.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, et al. (1991). "Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide." Biochem J **273**(Pt 3): 601-604.
- Ausman, K. and R. B. Weisman (1997). "Kinetics of fullerene triplet states." Research on Chemical Intermediates **23**(5): 431-451.
- Baines, C. P., R. A. Kaiser, et al. (2005). "Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death." Nature **434**(7033): 658-662.
- Bal-Price, A. and G. C. Brown (2000). "Nitric-oxide-induced necrosis and apoptosis in PC12 cells mediated by mitochondria." J Neurochem **75**(4): 1455-1464.
- Battino, R., T. R. Rettich, et al. (1983). "The Solubility of Oxygen and Ozone in Liquids." Journal of Physical and Chemical Reference Data **12**(2): 163-178.
- Baxendale, J. H., D. Beaumont, et al. (1970). "Hydrogen and ion yields in the  $\gamma$ -radiolysis of tetrahydrofuran." International Journal for Radiation Physics and Chemistry **2**(1): 39-43.
- Belousova, I. M., N. G. Mironova, et al. (2005). "A mathematical model of the photodynamic fullerene-oxygen action on biological tissues." Optics and Spectroscopy **98**(3): 349-356.
- Bertrand, V., L. Małgorzata, et al. (2005). "Singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) -mediated oxidation of cellular and subcellular components: ESR and AFM assays." Journal of Physics: Condensed Matter **17**(18): S1471.

- BLACK, #160, et al. (1993). O<sub>2</sub>(a[1]#916;[g]) production and quenching by C[60] and C[70]. Amsterdam, PAYS-BAS, Elsevier.
- Bonora, M. and P. Pinton The Mitochondrial Permeability Transition Pore and Cancer: Molecular Mechanisms Involved in Cell Death, *Front Oncol.* 2014;4:302. doi:10.3389/fonc.2014.00302.
- Bonora, M. and P. Pinton (2014). "The Mitochondrial Permeability Transition Pore and Cancer: Molecular Mechanisms Involved in Cell Death." Frontiers in Oncology 4: 302.
- Bosi, S., L. Feruglio, et al. (2004). "Hemolytic Effects of Water-Soluble Fullerene Derivatives." Journal of Medicinal Chemistry 47(27): 6711-6715.
- Brant, J., H. Lecoanet, et al. (2005). "Comparison of electrokinetic properties of colloidal fullerenes (n-C60) formed using two procedures." Environ Sci Technol 39(17): 6343-6351.
- Brant, J. A., J. Labille, et al. (2006). "Characterizing the Impact of Preparation Method on Fullerene Cluster Structure and Chemistry." Langmuir 22(8): 3878-3885.
- Braun, T., Á. Buvári-Barcza, et al. (1994). "Mechanochemistry: a novel approach to the synthesis of fullerene compounds. Water soluble buckminsterfullerene -  $\gamma$ -cyclodextrin inclusion complexes via a solid-solid reaction." Solid State Ionics 74(1-2): 47-51.
- Brettreich, M. and A. Hirsch (1998). "A highly water-soluble dendro[60]fullerene." Tetrahedron Letters 39(18): 2731-2734.
- Briviba, K., L. O. Klotz, et al. (1997). "Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems." Biol Chem 378(11): 1259-1265.
- Brown, G. C. and V. Borutaite (2002). "Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death." Free Radic Biol Med 33(11): 1440-1450.
- Brown, S. B., E. A. Brown, et al. (2004). "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment." Lancet Oncol 5(8): 497-508.
- Buttke, T. M. and P. A. Sandstrom (1994). "Oxidative stress as a mediator of apoptosis." Immunology Today 15(1): 7-10.
- Cadenas, E. (2004). "Mitochondrial free radical production and cell signaling." Mol Aspects Med 25(1-2): 17-26.

- Cai, H., S. Dikalov, et al. (2007). "Detection of reactive oxygen species and nitric oxide in vascular cells and tissues: comparison of sensitivity and specificity." Methods Mol Med **139**: 293-311.
- Cheng, X., A. T. Kan, et al. (2004). "Naphthalene Adsorption and Desorption from Aqueous C60 Fullerene." Journal of Chemical & Engineering Data **49**(3): 675-683.
- Chiang, L. Y., L.-Y. Wang, et al. (1994). "Efficient Synthesis of Polyhydroxylated Fullerene Derivatives via Hydrolysis of Polycyclosulfated Precursors." The Journal of Organic Chemistry **59**(14): 3960-3968.
- Clo, E., J. W. Snyder, et al. (2007). "Control and selectivity of photosensitized singlet oxygen production: challenges in complex biological systems." ChemBiochem **8**(5): 475-481.
- Cory, S., D. C. Huang, et al. (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." Oncogene **22**(53): 8590-8607.
- D'Autreaux, B. and M. B. Toledano (2007). "ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 813-824.
- Deguchi, S., R. G. Alargova, et al. (2001). "Stable Dispersions of Fullerenes, C60 and C70, in Water. Preparation and Characterization." Langmuir **17**(19): 6013-6017.
- Deguchi, S., S. Mukai, et al. (2006). "Facile Generation of Fullerene Nanoparticles by Hand-Grinding." Advanced Materials **18**(6): 729-732.
- Dhawan, A., J. S. Taurozzi, et al. (2006). "Stable colloidal dispersions of C60 fullerenes in water: evidence for genotoxicity." Environ Sci Technol **40**(23): 7394-7401.
- Draganic, I. G. (1971). The radiation chemistry of water [by] Ivan G. Draganic and Zorica D. Draganic. New York, Academic Press.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2004). "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy." Curr Opin Cell Biol **16**(6): 663-669.

- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." Toxicologic pathology **35**(4): 495-516.
- Fariss, M. W., C. B. Chan, et al. (2005). "Role of mitochondria in toxic oxidative stress." Mol Interv **5**(2): 94-111.
- Festjens, N., T. Vanden Berghe, et al. (2006). "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response." Biochim Biophys Acta: 8.
- Finsterer, J. and P. Ohnsorge (2013). "Influence of mitochondrion-toxic agents on the cardiovascular system." Regul Toxicol Pharmacol **67**(3): 434-445.
- Flick, D. A. and G. E. Gifford (1984). "Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor." J Immunol Methods **68**(1-2): 167-175.
- Foley, S., C. Crowley, et al. (2002). "Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative." Biochem Biophys Res Commun **294**(1): 116-119.
- Fortner, J. D., D. Y. Lyon, et al. (2005). "C60 in water: nanocrystal formation and microbial response." Environ Sci Technol **39**(11): 4307-4316.
- Fortner, J. D., D. Y. Lyon, et al. (2005). "C60 in Water: Nanocrystal Formation and Microbial Response." Environmental Science & Technology **39**(11): 4307-4316.
- Ghafourifar, P., U. Schenk, et al. (1999). "Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation." J Biol Chem **274**(44): 31185-31188.
- Gharbi, N., M. Pressac, et al. (2005). "[60]fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity." Nano Lett **5**(12): 2578-2585.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." Trends Biochem Sci **32**(1): 37-43.
- Guldi, D. M. and K.-D. Asmus (1999). "Activity of water-soluble fullerenes towards OH-radicals and molecular oxygen1." Radiation Physics and Chemistry **56**(4): 449-456.
- Guldi, D. M. and M. Prato (2000). "Excited-State Properties of C60 Fullerene Derivatives." Accounts of Chemical Research **33**(10): 695-703.
- Hortelano, S., B. Dallaporta, et al. (1997). "Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition." FEBS Lett **410**(2-3): 373-377.

- Isakovic, A., Z. Markovic, et al. (2006). "Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene." Toxicol Sci **91**(1): 173-183.
- Islam, M. F., E. Rojas, et al. (2003). "High Weight Fraction Surfactant Solubilization of Single-Wall Carbon Nanotubes in Water." Nano Letters **3**(2): 269-273.
- Janot, J.-M., E. Bienvenue, et al. (2000). "[60]Fullerene and three [60]fullerene derivatives in membrane model environments." Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2 **2**(2): 301-306.
- Keller, J. N., M. S. Kindy, et al. (1998). "Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction." J Neurosci **18**(2): 687-697.
- Kemp, M., Y. M. Go, et al. (2008). "Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology." Free Radic Biol Med **44**(6): 921-937.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Kratschmer, W., L. D. Lamb, et al. (1990). "Solid C60: a new form of carbon." Nature **347**(6291): 354-358.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.
- Kroto, H. W., J. R. Heath, et al. (1985). "C60: Buckminsterfullerene." Nature **318**(6042): 162-163.
- Krusic, P. J., E. Wasserman, et al. (1991). "Radical reactions of c60." Science **254**(5035): 1183-1185.
- Leach, S., M. Vervloet, et al. (1992). "Electronic spectra and transitions of the fullerene C60." Chemical Physics **160**(3): 451-466.
- Lemasters, J. J., A. L. Nieminen, et al. (1998). "The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy." Biochim Biophys Acta **10**: 1-2.
- Lenaz, G. (2001). "The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology." IUBMB Life **52**(3-5): 159-164.

- Lens, M. (2009). "Use of fullerenes in cosmetics." Recent Pat Biotechnol **3**(2): 118-123.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-489.
- Li, Y., N. Johnson, et al. (2004). "Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis." Biochem J **383**(Pt 1): 101-109.
- Lion, Y., M. Delmelle, et al. (1976). "New method of detecting singlet oxygen production." Nature **263**(5576): 442-443.
- Lyon, D. Y., L. K. Adams, et al. (2006). "Antibacterial Activity of Fullerene Water Suspensions: Effects of Preparation Method and Particle Size†." Environmental Science & Technology **40**(14): 4360-4366.
- Makha, M., A. Purich, et al. (2006). "Structural Diversity of Host–Guest and Intercalation Complexes of Fullerene C60." European Journal of Inorganic Chemistry **2006**(3): 507-517.
- Markovic, Z. and V. Trajkovic (2008). "Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C60)." Biomaterials **29**(26): 3561-3573.
- Matesanz, N., N. Lafuente, et al. (2007). "Xanthine oxidase-derived extracellular superoxide anions stimulate activator protein 1 activity and hypertrophy in human vascular smooth muscle via c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinases." J Hypertens **25**(3): 609-618.
- Matheson, I. B. C., R. D. Etheridge, et al. (1975). "THE QUENCHING OF SINGLET OXYGEN BY AMINO ACIDS AND PROTEINS." Photochemistry and Photobiology **21**(3): 165-171.
- Mirkov, S. M., A. N. Djordjevic, et al. (2004). "Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullereneol, C60(OH)24." Nitric Oxide **11**(2): 201-207.
- Monti, D., L. Moretti, et al. (2000). "C60 carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells." Biochem Biophys Res Commun **277**(3): 711-717.
- Mroz, P., G. P. Tegos, et al. (2007). "Photodynamic therapy with fullerenes." Photochem Photobiol Sci **6**(11): 1139-1149.

- Mulliken, R. S. (1928). "The Assignment of Quantum Numbers for Electrons in Molecules. I." Physical Review **32**(2): 186-222.
- Nakagawa, T., S. Shimizu, et al. (2005). "Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death." Nature **434**(7033): 652-658.
- Näther, D. U., J. R. Gilchrist, et al. (1993). "TEMPORAL and SPECTRAL SEPARATION OF SINGLET OXYGEN LUMINESCENCE FROM NEAR INFRARED EMITTING PHOTOSENSITIZERS." Photochemistry and Photobiology **57**: 1056-1059.
- Nicotera, P., F. Bernassola, et al. Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul, Cell Death Differ. 1999 Oct;6(10):931-3.
- Nicotera, P. and G. Melino (2004). "Regulation of the apoptosis-necrosis switch." Oncogene **23**(16): 2757-2765.
- Oberdörster, E., S. Zhu, et al. (2006). "Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C60) on aquatic organisms." Carbon **44**(6): 1112-1120.
- Orrenius, S., V. Gogvadze, et al. (2007). "Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 143-183.
- Ott, M., V. Gogvadze, et al. (2007). "Mitochondria, oxidative stress and cell death." Apoptosis **12**(5): 913-922.
- Pacher, P., J. S. Beckman, et al. (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev **87**(1): 315-424.
- Porter, A. E., K. Muller, et al. (2006). "Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography." Acta Biomater **2**(4): 409-419.
- Qiao, R., A. P. Roberts, et al. (2007). "Translocation of C60 and its derivatives across a lipid bilayer." Nano Lett **7**(3): 614-619.
- Raicevic, N., A. Mladenovic, et al. (2005). "Iron protects astrocytes from 6-hydroxydopamine toxicity." Neuropharmacology **48**(5): 720-731.
- Sayes, C. M., J. D. Fortner, et al. (2004). "The Differential Cytotoxicity of Water-Soluble Fullerenes." Nano Letters **4**(10): 1881-1887.

- Sayes, C. M., A. M. Gobin, et al. (2005). "Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation." Biomaterials **26**(36): 7587-7595.
- Sayes, C. M., A. A. Marchione, et al. (2007). "Comparative pulmonary toxicity assessments of C60 water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles." Nano Lett **7**(8): 2399-2406.
- Schmitz, I., H. Walczak, et al. (1999). "Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand." Cell Death Differ **6**(9): 821-822.
- Schrader, M. and H. D. Fahimi (2004). "Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species." Histochem Cell Biol **122**(4): 383-393.
- Simbre, V., II, S. Duffy, et al. (2005). "Cardiotoxicity of Cancer Chemotherapy." Pediatric Drugs **7**(3): 187-202.
- Snelling, D. R. (1968). "Production of singlet oxygen in the benzene oxygen photochemical system." Chemical Physics Letters **2**(5): 346-348.
- Srinivasula, S. M., R. Hegde, et al. (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." Nature **410**(6824): 112-116.
- Studer, S. L., W. E. Brewer, et al. (1989). "Time-resolved study of the photooxygenation of 3-hydroxyflavone." Journal of the American Chemical Society **111**(19): 7643-7644.
- Takada, H., K. Kokubo, et al. (2006). "Antioxidant activity of supramolecular water-soluble fullerenes evaluated by beta-carotene bleaching assay." Biosci Biotechnol Biochem **70**(12): 3088-3093.
- Thippeswamy, T., J. S. McKay, et al. (2006). "Nitric oxide, a biological double-faced janus--is this good or bad?" Histol Histopathol **21**(4): 445-458.
- Toninello, A., M. Salvi, et al. (2004). "Interaction of biologically active amines with mitochondria and their role in the mitochondrial-mediated pathway of apoptosis." Curr Med Chem **11**(17): 2349-2374.
- Ushmorov, A., F. Ratter, et al. (1999). "Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release." Blood **93**(7): 2342-2352.
- Victor, V. M., M. Rocha, et al. (2004). "Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis." Int Immunopharmacol **4**(3): 327-347.



- Wolff, D. J., A. D. Papoiu, et al. (2000). "Inhibition of nitric oxide synthase isoforms by tris-malonyl-C(60)-fullerene adducts." Arch Biochem Biophys **378**(2): 216-223.
- Worle-Knirsch, J. M., K. Pulskamp, et al. (2006). "Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays." Nano Lett **6**(6): 1261-1268.
- Xiao, L., H. Takada, et al. (2006). "The water-soluble fullerene derivative "Radical Sponge" exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes." Bioorg Med Chem Lett **16**(6): 1590-1595.
- Xiao, L., H. Takada, et al. (2005). "Antioxidant effects of water-soluble fullerene derivatives against ultraviolet ray or peroxy lipid through their action of scavenging the reactive oxygen species in human skin keratinocytes." Biomed Pharmacother **59**(7): 351-358.
- Yadav, B. and R. Kumar (2008). "Structure, properties and applications of fullerenes."
- Yamakoshi, Y., S. Sueyoshi, et al. (1998). " $\bullet$ OH and  $O_2^{\bullet-}$  Generation in Aqueous C60 and C70 Solutions by Photoirradiation: An EPR Study." Journal of the American Chemical Society **120**(47): 12363-12364.
- Yamakoshi, Y., N. Umezawa, et al. (2003). "Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C60) as potential medicines:  $O_2^{\bullet-}$  versus  $^1O_2$ ." J Am Chem Soc **125**(42): 12803-12809.
- Zhao, H., S. Kalivendi, et al. (2003). "Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide." Free Radic Biol Med **34**(11): 1359-1368.

## BIOGRAFIJA

Maja Misirkić Marjanović je rođena 08.5.1975. godine u Rumi. Diplomirala je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, 2005. godine sa prosečnom ocenom 9,17. Od januara 2007. godine radi u Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković" na Odeljenju za neurofiziologiju.

Naučno istraživački rad Maje Misirkić Marjanović realizovan je kroz projekte finansirane od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U periodu od 2007. do 2011. godine učestvovala je u realizaciji projekta "Citotoksični, citoprotektivni i imunomodulatorni efekti nanočestica" (evidencioni broj 145073 rukovodilac prof.dr Vladimir Trajković). Od 2011. godine učesnik je 2 projekta "Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja" (evidencioni broj 41025 rukovodilac prof.dr Vladimir Trajković) i "Uloga autofagije u regulaciji smrti tumorskih ćelija" (evidencioni broj 173053, rukovodilac dr Ljubica Harhaji-Trajković).

Koautor je 23 rada u međunarodnim časopisima.

**Prilog 1.**

## **Izjava o autorstvu**

Potpisani-a Maja Misirkić Marjanović

broj upisa \_\_\_\_\_

### **Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom

**Mehanizmi citotoksičnog i citoprotektivnog dejstva fullerenskih (C<sub>60</sub>) nanočestica**

---

---

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 5.5. 2015.

Maja Misirkić Marjanović

**Prilog 2.**

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora Maja Misirkić Marjanović

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada Mehanizmi citotoksičnog i citoprotektivnog dejstva fulerenskih (C<sub>60</sub>) nanočestica

Mentor Prof.dr Vladimir Trajković

Potpisani Maja Misirkić Marjanović

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

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

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 5.5.2015.

*Maja Misirkić Marjanović*

### Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

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

### Mehanizmi citotoksičnog i citoprotektivnog dejstva fulerenkih (C<sub>60</sub>) nanočestica

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 5.5. 2015.

Maja Mincuprić Marjanović

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