

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Martina Vragović

SINTEZA I KARAKTERIZACIJA POLIMERNIH NANOČESTICA S KONTROLIRANIM
OTPUŠTANJEM NITROKSIDNIH RADIKALA

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Martina Vragović

SINTEZA I KARAKTERIZACIJA POLIMERNIH NANOČESTICA S KONTROLIRANIM
OTPUŠTANJEM NITROKSIDNIH RADIKALA

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Damir Klepac, dipl. sanit. ing.

Komentori rada: Doc. dr. sc. Duško Čakara, dipl. ing. kemije

Prof. dr. sc. Srećko Valić, prof. fizike i kemije

Diplomski rad obranjen je dana 25.9.2020. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Srećko Valić, prof. fizike i kemije
2. Izv. prof. dr. sc. Marin Tota, mr. ph.
3. Doc. dr. sc. Damir Klepac, dipl. sanit. ing.

Rad ima 51 stranicu, 22 slike, 58 literaturnih navoda.

Rad je izrađen na Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta u Rijeci te dijelom u Laboratoriju za koloide, polielektrolite i međupovršine pri Centru za mikro- i nanoznanosti i tehnologije Sveučilišta u Rijeci, Laboratoriju za magnetske rezonancije Instituta Ruđer Bošković i na Institutu za makromolekularnu kemiju Češke akademije znanosti u Pragu.

Najviše se zahvaljujem svojem mentoru, Doc. dr. sc. Damiru Klepcu, dipl. sanit. ing., na svom uloženom trudu i vremenu, prenesenom znanju i nesebičnoj pomoći.

Bez njega na znanost ne bih gledala na isti način.

Zahvaljujem se svojem komentoru Doc. dr. sc. Dušku Čakari, dipl. ing. kemije, na gostoprimstvu u Laboratoriju za koloide, polielektrolite i međupovršine pri Centru za mikro- i nanoznanosti i tehnologije Sveučilišta u Rijeci.

Zahvaljujem se Prof. dr. sc. Srećku Valiću, prof. fizike i kemije, na gostoprimstvu u Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu i na pomoći pri mjerenjima na ESR spektrometru.

Zahvaljujem se Dr. sc. Petru Chytilu, s Instituta za makromolekularnu kemiju Češke akademije znanosti u Pragu, na pomoći pri sintezi uzoraka.

Zahvaljujem se Dr. sc. Samiju Kereičhu s Prvog Medicinskog fakulteta na Karlovom sveučilištu u Pragu, na cryo-TEM mjerenjima.

Posebno hvala Mami, Tati, Seki, Irini, Monici i Dori na pruženoj potpori kroz cijeli studij.

SAŽETAK

Nitroksidni radikali su organske molekule koje imaju jedinstvena antioksidacijska svojstva te mogu suzbiti rast tumora. U *in vivo* uvjetima, ovi radikali ne mogu se učinkovito koristiti jer se nespecifično akumuliraju u zdravom tkivu te se brzo izlučuju iz organizma. U ovom radu istraživane su nanočestice temeljene na poli[*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamidu] (poli(HPMA)) i kolesterolu koje sadrže TEMPONE radikal vezan hidrazonskom (RNP-H) i peptidnom vezom (RNP-P). Veličina i oblik nanočestica određeni su metodom krio-transmisijske elektronske mikroskopije. Utvrđeno je da su dobivene nanočestice sferičnog oblika prosječne veličine 25–50 nm. Otpuštanje radikala s nanočestica praćeno je metodom elektronske spinske rezonancije (ESR) u rasponu pH vrijednosti od 7,4 do 5,0. Pokazano je da u kiseloj sredini koja je karakteristična za tumorske stanice dolazi do brzog otpuštanja radikala vezanih hidrazonskom vezom dok nanočestice koje sadrže radikale vezane peptidnom vezom ostaju stabilne. Nasuprot tome, u fiziološkim uvjetima ne dolazi do značajnog oslobađanja radikala ni sa jedne vrste nanočestica. Ovim istraživanjem pokazano je da se polimerne nanočestice mogu koristiti kao nosači nitroksidnih radikala u novom pristupu terapiji tumora kada se žele izbjeći neželjene nuspojave slobodnih radikala i produžiti njihovo zadržavanje u organizmu.

KLJUČNE RIJEČI: nitroksidni radikali, HPMA, nanočestice, ESR, krio-TEM, DLS

SUMMARY

Nitroxide radicals are organic molecules that possess unique antioxidant properties and can suppress tumor growth. Under *in vivo* conditions, these radicals can not be used effectively because they accumulate nonspecifically in healthy tissue and are rapidly removed from the body. In this work, we investigated nanoparticles based on poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] (poly(HPMA)) and cholesterol containing a TEMPONE radical bound by a hydrazone (RNP-H) and peptide bond (RNP-P) respectively. The size and shape of the nanoparticles were determined by cryo-transmission electron microscopy. Spherical nanoparticles with an average size of 25–50 nm were obtained. The release of radicals from the nanoparticles was investigated by electron spin resonance (ESR) spectroscopy in the pH range from 7.4 to 5.0. It was shown that the radicals bound by hydrazone bond are rapidly released in an acidic environment which is characteristic for tumor cells, while the nanoparticles containing radicals bound by peptide bond remain stable. In contrast, there is no significant release of radicals from both types of nanoparticles under physiological conditions. This research has shown that polymer nanoparticles can be used as a carriers of nitroxide radicals in a new approach to tumor therapy when we want to avoid unwanted side effects of free radicals and prolong their retention in the body.

KEYWORDS: nitroxide radicals, HPMA, nanoparticles, ESR, cryo-TEM, DLS

SADRŽAJ

1.	UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1.	NANOMATERIJALI	1
1.2.	NANOČESTICE	2
1.2.1.	Vrste nanočestica.....	3
1.3.	DOSTAVA LIJEKOVA NA CILJANO MJESTO	6
1.3.1.	Pasivno ciljanje lijekova.....	6
1.3.2.	Aktivno ciljanje lijekova	7
1.4.	PRIMJENA NITROKSIDNIH RADIKALA U MEDICINI.....	10
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3.	MATERIJALI I METODE.....	13
3.1.	MATERIJALI	13
3.1.1.	Sinteza monomera	13
3.1.2.	Sinteza polimernog prekursora za pripravu uzorka s hidrazonskom vezom	13
3.1.3.	Sinteza polimernog konjugata za pripravu nanočestice RNP-H.....	15
3.1.4.	Sinteza polimernog prekursora za pripravu uzorka s peptidnom vezom.....	16
3.1.5.	Sinteza polimernog konjugata za pripravu nanočestice RNP-P	17
3.1.6.	Priprava nanočestica RNP-H i RNP-P.....	17
3.2.	METODE	18
3.2.1.	Krio - elektronska mikroskopija (cryo- TEM)	18
3.2.2.	Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS)	22
3.2.3.	Elektronska spinska rezonancija (ESR).....	26
4.	REZULTATI	30
4.1.	ODREĐIVANJE MORFOLOGIJE I VELIČINE NANOČESTICA.....	30
4.2.	OTPUŠTANJE NITROKSIDNIH RADIKALA SA NANOČESTICA	34
5.	RASPRAVA.....	38
6.	ZAKLJUČAK	42
7.	LITERATURA	43
	ŽIVOTOPIS	51

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Nanotehnologija je interdisciplinarno područje koje ujedinjuje fiziku, kemiju, znanost o materijalima i inženjerstvo, a odnosi se na strukture čije su maksimalne dimenzije 100 nm s različitim i specifičnim fizikalnim i kemijskim svojstvima.¹

Nanomedicina je inovativno polje nanotehnologije koje uključuje upotrebu materijala u nanoveličinama u svrhu prevencije, dijagnoze i liječenja različitih bolesti. Takvi materijali imaju jedinstvena fizikalno–kemijska i biološka svojstva poput karakterističnih veličina, velikog omjera površine i mase te velikih reaktivnih površina¹, što ih čini različitima u odnosu na iste materijale većih dimenzija.² Upotreba materijala takvih obilježja omogućuje jednostavniju manipulaciju njihovih osnovnih svojstava kao što su topljivost, difuznost, poluvrijeme života u cirkulaciji, karakteristike oslobađanja lijeka i imunogenost te sposobnost prolaska kroz barijere stanica i tkiva. U posljednja dva desetljeća broj terapijskih i dijagnostičkih sredstava na bazi nanomaterijala je u porastu, a njihova primjena je zabilježena u dijagnosticiranju dijabetesa, liječenju astme, alergija i različitih vrsta infekcija. Najveći potencijal njihove primjene pokazao se u liječenju raka.^{3,4}

1.1. NANOMATERIJALI

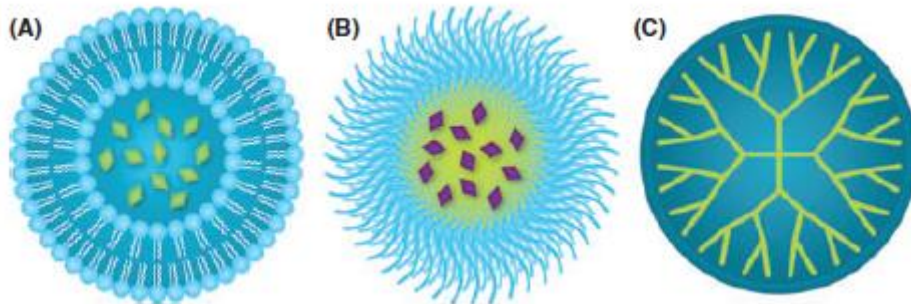
Nanomaterijali su u redu veličine slični proteinima i drugim makromolekularnim strukturama koje se nalaze unutar živih stanica i kao takvi mogu iskoristiti prednosti postojećih staničnih mehanizama za olakšavanje isporuke lijekova. Priprava polimernih nanomaterijala, dendrimera i polimernih micela sve je češća tema u znanosti o biomaterijalima zbog njihovih jedinstvenih svojstava i ogromnog potencijala u isporuci lijekova.^{5,6} Polimer koji se koristi za pripravu nanomaterijala za isporuku lijekova treba biti biokompatibilan i biorazgradiv.

1.2. NANOČESTICE

Nanočestice su strukture kojima je najmanje jedna dimenzija veličine 1 – 100 nm. Glavne su platforme, unutar područja nanomedicine, za poboljšanje isporuke kemoterapeutika.⁷ Nanočestice koje sadrže kapsulirane, dispergirane, apsorbirane ili konjugirane lijekove imaju jedinstvene karakteristike koje mogu dovesti do pojačanih učinaka u različitim oblicima doziranja. Kada su pravilno formulirane, čestice lijeka se ne talože i mogu imati veću topivost od zasićenja, brzo se otapaju te pojačano prijanjaju za biološke površine pružajući tako brzi početak terapijskog djelovanja i poboljšanu bioraspodivnost.⁸ Osim toga, većina molekula u nanostrukтури nalazi se na površini čestica⁹ čime se maksimalno povećava isporuka terapijskih lijekova, proteina i polinukleotida ciljanim stanicama i tkivima. Visoko učinkovita isporuka lijekova, zasnovana na nanomaterijalima može potencijalno smanjiti dozu lijeka koja je potrebna za postizanje terapijske koristi, što znači da se potencijalno, smanjuju troškovi i / ili nuspojave povezane s određenim lijekovima. Nadalje, veličina i karakteristike površine mogu se lako manipulirati kako bi se postiglo pasivno i aktivno ciljanje lijekova.⁸ Upravo takva svojstva omogućuju bolju efikasnost pri liječenju u odnosu na konvencionalne metode. Ograničenja konvencionalne primjene lijekova leže u ograničenoj učinkovitosti, slaboj distribuciji te nedostatku selektivnosti.¹⁰ Ta se ograničenja prevladavaju primjenom kontrolirane dostave lijekova u kojoj lijek dolazi točno na određeno mjesto čime se umanjuje njegov utjecaj na ostala tkiva, a time i neželjene nuspojave. Kako bi isporuka bila učinkovita, lijekovi dolaze do određenog mjesta uz minimalan gubitak volumena i aktivnosti u krvotoku. S druge strane, lijekovi trebaju uništiti tumorske stanice bez utjecaja na zdrave stanice. Kako bi nanonosači bili primjenjivi u medicinskoj primjeni moraju se integrirati u biološki sustav bez pokretanja kaskade imunoloških reakcija. Prema dosadašnjim istraživanjima, nanočestice su pokazale veliki potencijal u primjeni kontrolirane dostave lijekova jer ispunjavaju sve potrebne uvjete.¹¹

1.2.1. Vrste nanočestica

Vrste nanočestica koje su uspostavljene kao platforme za isporuku lijekova u liječenju raka su liposomi, polimerne micelle i dendrimeri čije su strukture prikazane na slici 1.⁷



Slika 1. Nanočestice za dostavu lijekova za liječenje tumora. (A) Liposomi sastavljeni od hidrofobne membrane i hidrofilne jezgre koja sadrži hidrofilne lijekove. (B) Polimerne micelle sastavljene od hidrofilne korone i hidrofobne jezgre koja sadrži lipofilne lijekove. (C) Dendrimeri sastavljeni od više grana koje izlaze iz središnje jezgre. Preuzeto iz literaturnog navoda 7.

Liposomi

Liposomi su nanostrukture (približnog promjera oko 100 nm) građene od dvoslojne membrane. Membranu čine fosfolipidi s hidrofilnim glavama te hidrofobnim repovima koji sadrže anionske ili kationske lance. Njihov vodeni rezervoar omogućava inkapsulaciju širokog spektra hidrofilnih sredstava, uključujući lijekove i siRNA.¹² Osim toga, hidrofobna membrana može inkapsulirati molekule hidrofobnih lijekova te spriječiti njihovo istjecanje iz jezgre. 1995. godine FDA je odobrila upotrebu liposomske formulacije doksorubicina (Doxil) za liječenje Kaposijevog sarkoma.^{13,14} Ova platforma je rezultirala značajnim smanjenjem kardiotoksičnosti, a poluživot doksorubicina u cirkulaciji povećao se s 10 min do 50 h.¹⁵

Polimerne micelle

Polimerne micelle su nanostrukture (veličine do 100 nm) čije su jezgre veće od površinski aktivnih tvari što omogućuje veći kapacitet otapanja u usporedbi s nepolimernim micelama.¹⁶ To su jedinstveni sustavi u kojima su agregirani amfifilni kopolimeri u dinamičkoj ravnoteži sa slobodnim unimerima. Upotreba micela pripremljenih od amfifilnih kopolimera privukla je mnogo pažnje kod primjene hidrofobnih lijekova.¹⁷ Jedinstvena svojstva polimernih micela, uključujući veličinu, visoku stabilnost i nisku kritičnu koncentraciju micela, kvalificiraju ih kao atraktivne kandidate za upotrebu u sustavima za isporuku lijekova za kliničku primjenu, posebno za hidrofobne lijekove koji imaju slabu topljivost u vodi.¹⁸ Polimerne micelle dijele se u dvije skupine ovisno o načinu ugradnje lijeka. Kod fizičke ugradnje, lijek je vezan u miceli hidrofobnim interakcijama.¹⁹ Kod kovalentno konjugiranih lijekova, lijek se stabilno veže u jezgri micelle sve do njegovog otpuštanja potaknutog generiranim podražajima pomoću iona, signalnih peptida, enzima i pH. Micelle koje reagiraju na stimulanse potencijalni su sustavi za dostavu lijekova. Osjetljive su na male promjene u okolini koje omogućuju oslobađanje molekula lijeka na ciljanim mjestima.⁷ Lijekovi se mogu nalaziti unutar polimerne matrice, ili konjugirani na površini nanočestice. U polimernim nanočesticama inkapsulirane molekule lijeka su zaštićene od hidrolize i enzimske degradacije. Općenito, polimerne nanočestice sadrže jezgru i koronu. Jezgra se sastoji od guste polimerne matrice u koju se može ugraditi hidrofobni lijek. Struktura jezgra – korona može se mijenjati promjenom sastava hidrofilnih i hidrofobnih skupina na polimerima. Takva se struktura sastoji od hidrofilnih polimera poput različitih polisaharida koji služi za održavanje steričke stabilnosti polimernih nanočestica nakon intravenske primjene. Poli(ϵ -kapolakton) (PCL), poli(mliječna kiselina) (PLA), želatina i kitozan su neki od polimera koji se koriste u terapijske svrhe. Zbog biokompatibilnosti ili biorazgradivosti, ovi su polimeri dobri kandidati za dostavu lijekova.^{20,2} U usporedbi sa slobodnim lijekovima,

polimerne nanočestice imaju nekoliko drugih prednosti, uključujući poboljšanu bioraspodivnost lijeka, visoku stopu nosivosti, mogućnost kontroliranog oslobađanja lijeka, prilagođavanje različitim načinima primjene i koncentriranja na različitim infektivnim mjestima zahvaljujući poboljšanoj propusnosti i zaštiti samog lijeka. Nanočestice koje sadrže konjugirane specifične molekule pokazale su poboljšanje u ciljanju specifičnih stanica i tkiva.²¹ Veličina nanočestica kao i profil oslobađanja lijeka mogu biti precizno podešeni tijekom sinteze odabirom različitih vrsta polimera, duljine lanca polimera, površinski aktivnih tvari i otapala.²¹ Do danas je razvijeno nekoliko polimernih micela za isporuku lijeka zasnovanu na različitim podražajima, kao što su temperatura²¹, pH¹⁶ i magnetsko polje. Nekoliko micelarnih formulacija trenutno se nalazi u različitim fazama kliničkih ispitivanja. PEG-PLA micela koja sadrži paklitaksel, Genexol-PM, ispitivana je u kliničkoj studiji faze II na pacijentima s metastatskim karcinom dojke.²²

Dendrimeri

Dendrimeri su nanočestice (veličine oko 10 nm) sastavljene od više jedinica sa terminalnim skupinama koje se granaju iz središnje jezgre.²³ Definirani su kao globularne, višestruko razgranate, makromolekularne strukture koje imaju tri glavne komponente, žarište, periferni sloj koji se sastoji od različitih funkcionalnih skupina i unutarnji sloj sastavljen od nekoliko građevnih blokova. Više krakova proteže se od središnje jezgre koja je promjera oko 2–10 nm.²⁴ Vrlo razgranata priroda dendrimera također pruža veliki omjer veličine i površine. Mogu sadržavati višestruka i različita terapijska sredstva, bilo da su konjugirana, povezna s krajem funkcionalne skupine²⁴ ili enkapsulirana unutar središnje šupljine i/ili unutar kanala između dendrona. Kontrolirana depolimerizacija dendrimera rezultira visoko prilagodljivim profilima oslobađanja. Kemijski sastav dendrimera, građenog od poliamidoamina (PAMAM), može se modificirati kako bi se povećala biokompatibilnost ili kako bi se poboljšalo ciljanje tumora vezanjem za ligande. Dendrimeri su pokazali veliki potencijal u terapiji protiv raka u

pretkliničkoj studiji koja je uključivala polilizinske dendrimere namijenjene ciljanju aktiviranog $\alpha 5\beta 1$ integrina, važnog u invaziji tumorskih stanica i metastaza.²⁵ Yao i suradnici pokazali su da formulacija dendrimera koji sadrži Pro-His-Ser-Cys-Asn (PHSCN) peptid, koji se veže na aktivirani $\alpha 5\beta 1$, ometa prodor tumora MDA-MB-231 u plućima miševa od 700 do 1100 puta više nego slobodni peptid. Štoviše, PHSCN dendrimer smanjio je broj nastalih metastaza u plućima.

1.3. DOSTAVA LIJEKOVA NA CILJANO MJESTO

Dostava lijekova je metoda primjene farmaceutske komponente ili lijeka kako bi se postigao terapijski učinak kod ljudi ili životinja. Krajnji cilj sustava dostave je prilagodba formulacija lijeka u svrhu ostvarivanja pojedinačnih potreba pod kontrolom patofizioloških faktora.³ Takvi sustavi isporuke nude nekoliko prednosti, uključujući poboljšanu učinkovitost, smanjenu toksičnost, poboljšanu usklađenost i udobnost pacijenta u usporedbi s konvencionalnim oblicima doziranja. Istraženo je nekoliko sustava isporuke lijekova s različitim načinima primjene. Za razliku od tradicionalnih oblika doziranja, novi sustavi isporuke lijeka imaju za cilj isporuku lijeka usmjerenu prema potrebama tijela tijekom razdoblja liječenja, a bioaktivni entitet usmjerava se na mjesto djelovanja čime se smanjuju nuspojave na drugim mjestima.⁷

1.3.1. Pasivno ciljanje lijekova

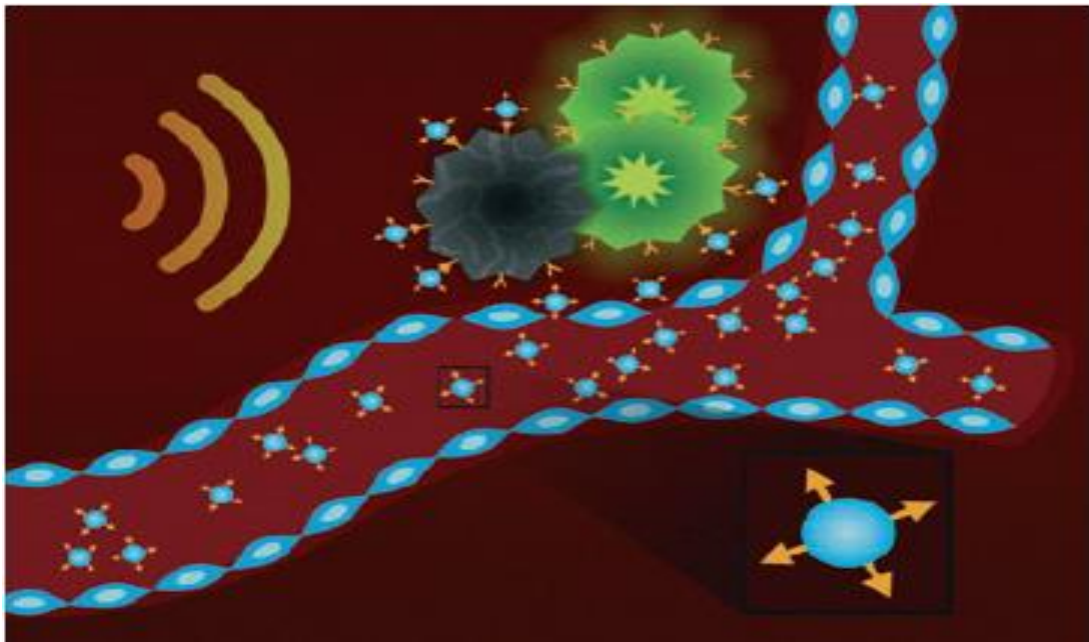
Pasivna ciljana dostava lijekova temelji se na patofiziološkim karakteristikama tumora. Kad veličina tumora dosegne vrijednost 2 mm^3 , tumor postaje difuzijski ograničen. To onemogućuje dostatan unos hrane, izlučivanje otpadnih tvari te isporuku kisika. Posljedično tome dolazi do povećanja okolne vaskulature, odnosno do procesa angiogeneze. Tumorsko tkivo karakterizira brza proliferacija, a žile koje nastaju imaju nepravilnu strukturu endotela te im nedostaje bazalna membrana. Posjeduju velik broj pora veličina od 100 nm do 2000 nm,

ovisno o vrsti tumora, mjestu na kojem se nalazi te njegovom okruženju.⁶ Takve tumorske fenestracije omogućuju ulaz tvari u tumorski intersticij. Intersticijski krvni tlak je viši u središtu tumora nego na periferiji jer nema dobro definirani limfni sustav. Povećani unutarnji tlak uzrokuje vanjski konvekcijski intersticijski protok tekućine koji smanjuje difuziju lijeka u središte tumora. Međutim, lijekovi i nanočestice koje dobivaju intersticijski pristup tumoru imaju duže zadržavanje nego u zdravim tkivima.²⁶ Zbog slabo definiranog limfnog sustava dolazi do smanjene drenaže pa posljedično tome nema dostatnog uklanjanja makronutrijenta iz intersticija te dolazi do njihovog nakupljanja i zadržavanja nanočestica u središtu tumora. Kombinacija nepropusne vaskulature i loše limfne drenaže rezultira efektom pojačane propusnost i zadržavanja (engl. *enhanced permeability and retention effect*, EPR), a upravo se te karakteristike tumora koriste pri pasivnoj ciljanoj dostavi lijekova.⁸ S druge strane, tumorske stanice rastu u specifičnom mikrokolišu. Zbog visoke metaboličke aktivnosti brzorastućih stanica opskrba kisikom i hranjivim tvarima nije im dostatna. Upravo zbog toga tumorske stanice koriste metabolički put glikolize kako bi bila osigurana dovoljna količina energije, a to rezultira stvaranjem kisele okoline. Ta se činjenica može iskoristiti pri dizajniranju novih lijekova.²⁷

1.3.2. Aktivno ciljanje lijekova

Sustav primjene nosača s lijekom koji ovisi isključivo o pasivnim mehanizmima ciljanja neizbježno se suočava s ograničenjima svoje specifičnosti. Jedan pristup za savladavanje tih ograničenja je uključivanje ciljanog liganda (antitijela, peptida ili malih molekula) u konjugat nosač-lijek, odnosno pristup aktivnog ciljanja lijekova.²⁸ Aktivno ciljanje uključuje isporuku lijekova na specifično mjesto koje se temelji na molekularnom prepoznavanju. Pri tome dolazi do povezivanja liganada koji su vezani na receptore na površini ciljanih stanica i nanonosaa. Vezanje liganda i receptora dovodi do ekspresije receptora ili epitopa na površini stanice. Tu interakciju prepoznaje nanonosaa koji se veže na ligand, slika 2. Kako bi se postigla visoka

specifičnost receptori trebaju biti visoko eksprimirani na tumorskim stanicama, njihova receptorska ekspresija treba biti homogena i ne bi trebala ni na koji način ulaziti u krvotok.²⁹ Internalizacija ciljanog liganda nakon vezanja na ciljne stanice važan je kriterij u odabiru vrste liganda. Internalizacija se obično vrši putem endocitoze posredovane receptorima. Najbolji primjer za to je receptor za folat. Kad se konjugat usmjeren na folat veže s receptorom folata na staničnoj površini dolazi do invaginacije membrane oko kompleksa ligand – receptor.²⁸ Tako se formira endosom koji se prenosi do specifičnih organela. Lijek iz endosoma može se otpustiti djelovanjem kiselog pH ili djelovanjem enzima.⁸



Slika 2. Funkcionalizacija nanočestice za aktivno ciljanje i kontrolirano otpuštanje lijekova putem vanjskih podražaja. Aktivnim ciljanjem nanočestice se vezuju za receptore koji su izraženi na tumorima pojačavajući njihovo specifično mjesto akumuliranja. Nakon lokalizacije na mjestu tumora vanjski podražaji poput ultrazvuka i povišenja temperature mogu utjecati na oslobađanje lijekova. Preuzeto iz literaturnog navoda 6.

Kada pH vrijednost u unutrašnjosti endosoma postaje kisela dolazi do aktivacije lizosoma te se lijek oslobađa iz konjugata i ulazi u citoplazmu uz uvjet da lijek ima odgovarajuća fizikalno-kemijska svojstva koja omogućuju prijelaz u endosomalnu membranu. Tako lijek

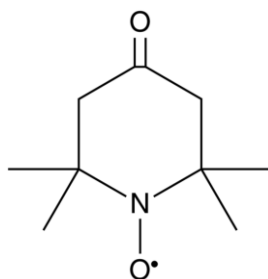
dolazi do ciljanih organela. Folatni receptor otpušten s konjugata vraća se na staničnu membranu i cijeli proces ciljanog otpuštanja kreće ispočetka. Folatni receptor je dobro poznati tumorski marker koji veže vitaminske folate i konjugate lijeka iz folata s visokim afinitetom te prenosi ove vezane molekule u stanice putem endocitoze posredovane receptorima.²⁸ Produljeno vrijeme cirkulacije omogućit će učinkovit transport konjugata lijek- nosač do mjesta tumora kroz EPR učinak, a ciljna molekula može povećati endocitozu ciljanih stanica. Internalizacija sustava za davanje lijekova s nanočesticama pokazala je povećan terapijski učinak.^{27,30} Ako se nanočestica pričvrsti na vaskularne endotelne stanice neinternalizirajućim epitopom, visoke lokalne koncentracije lijeka bit će dostupne na vanjskoj površini ciljne stanice. Iako je tako veća učinkovitost u odnosu na lijek bez nosača, samo će se dio otpuštenog lijeka isporučiti u ciljanu stanicu. U većini slučajeva internalizacija nanočestica je važna za učinkovitu isporuku nekih antikancerogenih lijekova, posebno u primjeni gena, prigušivanju gena i drugim bioterapeuticima.²⁷

Nanočestice koje se koriste u kliničkim ispitivanjima relativno su jednostavne i općenito nemaju aktivno ciljanje ili aktivirane komponente oslobađanja lijeka. Kako bi se u potpunosti istražilo aktivno ciljanje potrebno je ispitati jesu li specifične bolesti pogodne za aktivno ciljanje, da li su svojstva terapijskih lijekova kao i njihova lokacija i način djelovanja prikladni za ciljanje i jesu li dostavna sredstva optimalna za razvoj proizvoda.²⁹

1.4. PRIMJENA NITROKSIDNIH RADIKALA U MEDICINI

Ciklički nitroksidi raznolika su skupina stabilnih slobodnih radikala. Stabilnost im omogućuju metilne skupine koje se nalazi u α -položaju i tako ograničavaju pristup reaktivnim vrstama. Supstitucijske skupine na prstenu mogu stvarati velik broj spojeva koji se mogu usmjeriti na određene hidrofilne ili hidrofobne regije u staničnom mikrookolišu pa zbog toga imaju jedinstvena antioksidativna svojstva. Utvrđeno je da nitroksidi utječu na mnoge metaboličke procese modificirajući oksidativni stres i mijenjajući redoks status tkiva. Te se interakcije mogu iskoristiti u terapijske i istraživačke svrhe,³¹ kao zaštita od ionizirajućeg zračenja, kao probe u funkcionalnoj magnetskoj rezonanciji³², u kontroli hipertenzije i pretilosti, zaštiti od oštećenja koja su posljedica ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda, kao i u prevenciji i liječenju raka.³¹ Dosadašnja istraživanja na stanicama u *in vitro* uvjetima pokazala su da nitroksidni radikali povoljno reguliraju oksidacijsko-redukcijske uvjete u stanici te time poboljšavaju biološke funkcije stanice.³³ Ovi radikali također mogu uzrokovati apoptozu stanica raka te tako zaustaviti rast tumora.^{34,35} Nedavnim istraživanjem nitroksidnih spojeva utvrđeno je da mijenjaju cjelokupni redoks potencijal tkiva na staničnoj razini, za razliku od dosad istraživanih kemoterapeutskih lijekova koji su bili usmjereni samo na specifičnu molekularnu metu.³⁶ U nizu studija, C3H miševi dobivali su radikal 4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPOL) u vodi za piće, što je rezultiralo smanjenjem incidencije tumora od 75% kod miševa liječenih TEMPOL-om u usporedbi s kontrolnom skupinom.³⁶ Također, TEMPOL se primjenjivao kontinuirano na mišji model za ataksiju-teleangiektaziju.³⁷ Iako TEMPOL nije promijenio karakteristike limfoma timusa, primjena radikala je značajno odgodila početak napredovanja bolesti, što je rezultiralo produljenim životnim vijekom s 30,1 tjedana na 62,4 tjedna. Studije su potvrdile činjenicu da se u takvim organizmima smanjuje broj reaktivnih vrste kisika (engl. *reactive oxygen species, ROS*), što je jedan od razloga zašto nitroksidni radikali imaju terapijsku svrhu.^{37,38} Posljedica veće količine

ROS-a je mogućnost nastanka oksidacijskog stresa koji doprinosi razvoju različitih bolesti kao što su astma, ishemija, hipertenzija, neurološki poremećaji i rak.³¹ Ove studije dokazale su da ROS igraju važnu ulogu u tumorogenezi i da nitroksidi mogu potencijalno utjecati na njihovo smanjenje, upravo zbog toga što mogu hvatati superoksidge te hidroksidne i peroksidne radikale.³³ Međutim, nitroksidni radikali se nespecifično akumuliraju u normalnom tkivu i brzo reduciraju u oblik hidroksilamina pa se ne mogu učinkovito koristiti. Također, zbog svoje male molekulske mase radikali brzo izlaze iz cirkulacije i izlučuju se iz organizma.³⁹ Ove nedostatke moguće je prevladati korištenjem nosača radikala, odnosno nanočestice na koju će radikal biti kovalentno vezan. Na taj način onemogućuje se akumuliranje radikala u nespecifičnim tkivima, a u tumorima, gdje reguliraju oksidacijsko-redukcijske uvjete, ne dolazi do njihove brze redukcije u oblik hidroksilamina. U ovom radu korišten je radikal 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPONE), slika 3.



Slika 3. Shematski prikaz nitroksidnog radikala 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksila (TEMPONE).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga istraživanja bio je prirediti polimerne nanočestice koje bi omogućile produljeno zadržavanje nitroksidnih radikala u organizmu te njihovo kontrolirano oslobađanje u tumoru bez akumulacije u zdravom tkivu. Na taj način značajno bi se smanjile neželjene nuspojave slobodnih radikala u organizmu te bi se radikali zaštitili od brze razgradnje. Drugi cilj rada bio je ispitati kako vrsta veze kojom su nitroksidni radikali vezani na nanočestice utječe na otpuštanje radikala u uvjetima karakterističnim za tumorske stanice.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

2,2'-Azobisisobutironitril (AIBN), 2-cijanopropan-2-il ditiobenzoat (CTA-AIBN), 2,4,6-trinitrobenzen-1-sulfonska kiselina (TNBSA), octena kiselina, metakriloil klorid, metanol, *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA), *N,N*-dimetilacetamid (DMA) i *t*-butanol kupljeni su od kompanije Sigma-Aldrich, a 2,2'-azobis(4-metoksi-2,4-dimetilvaleronitril) (V-70) nabavljen je od kompanije Fujifilm Wako Chemicals Europe.

3.1.1. Sinteza monomera

N-(2-hidroksipropil)metakrilamid (HPMA), 3-(3-metakrilamidopropanoil)tiazolidin-2-tion (MA-AP-TT) i kolest-5en-3 β -il 6-metakrilamido heksanoat (MA-AH-kolesterol) su sintetizirani kao što je prethodno opisano.⁴⁰⁻⁴²

3.1.2. Sinteza polimernog prekursora za pripravu uzorka s hidrazonskom vezom

Statistički kopolimerni prekursor koji sadrži HPMA, MA- β -Ala-TT i hidrofobni kolesterol priređen je polimerizacijom s povrativim prijenosom lančane reakcije (RAFT), uz 4-cijano-4-(tiobenzoiltio)pentansku kiselinu (CTA-AIBN) kao sredstvo za prijenos lanca i 2,2'-azobis(4-metoksi-2,4-dimetilvaleronitril) V-70 kao inicijator u molarnom omjeru 350/2/1 (monomer/CTA-AIBN/V-70). Molarni omjer monomera HPMA/MA- β -Ala-TT/MA-AH-kolesterol bio je 88/10/2 uz 6,4 mol. % tiazolidin-2-tionskih (TT) skupina i 1,8 mol. % kolesterola. Polimerizacija je provedena u smjesi *t*-butanol/DMA (9/1) pri 40 °C tijekom 16 sati, a ditiobenzoatna krajnja skupina uklonjena je kao što je opisano prethodno.⁴³ Konačni kopolimerni prekursor dobiven je aminolizom TT skupina pomoću hidrazin monohidrata.

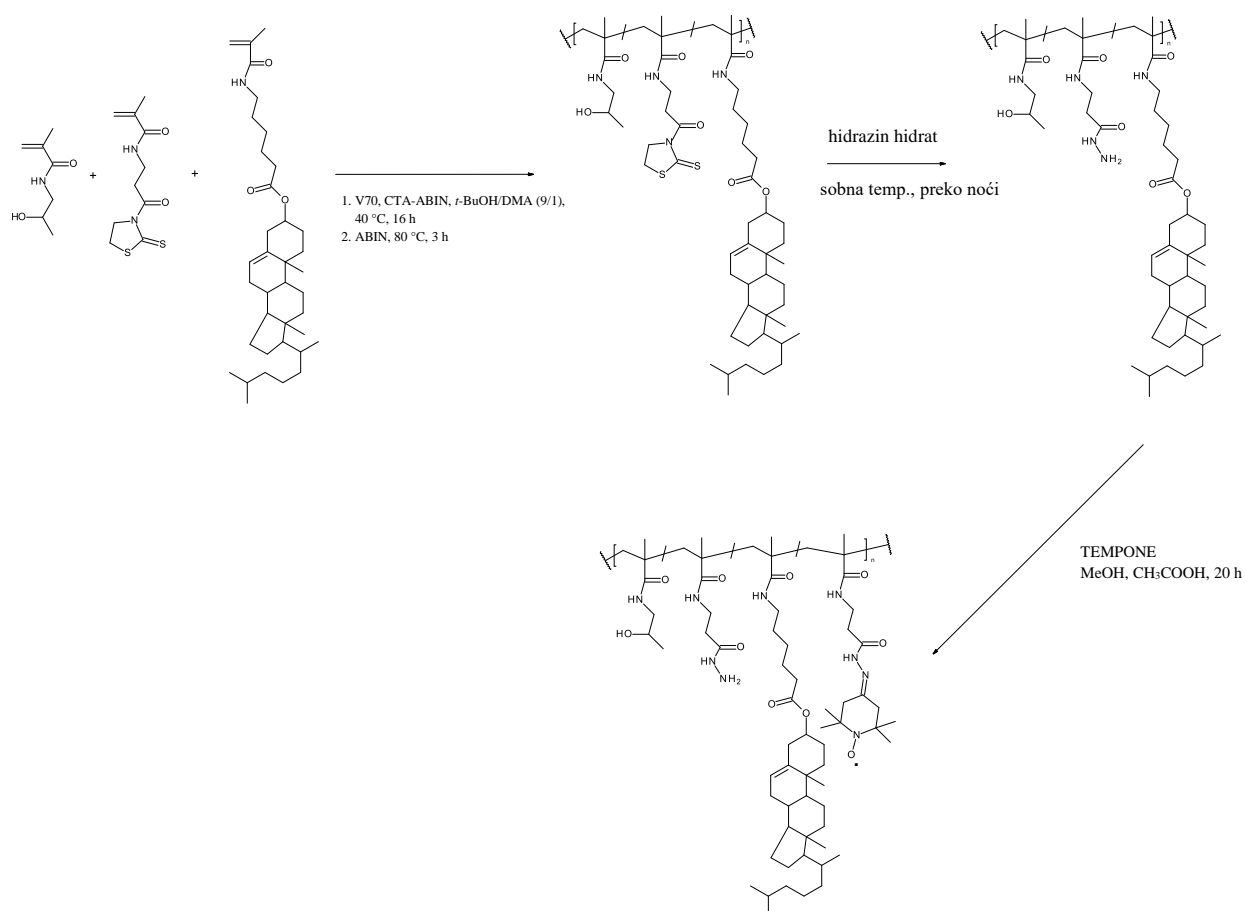
Detaljan postupak sinteze

HPMA (4,0 g, 28,2 mmol), MA-Acap-kolesterol (363,3 mg, 0,6 mmol) i CTA-AIBN (40,4 mg, 182,9 μ mol) otopljeni su u *t*-butanolu (41,1 mL) i pomiješani s otopinom MA- β -Ala-TT (826,7 mg, 3,2 mmol) i V-70 (28,2 mg, 91,4 μ mol) u DMA (4,6 mL). Reakcijska smjesa prelivena je u staklenu ampulu, propuhana argonom i zatvorena. Nakon 16 sati u termostatiranoj vodenoj kupelji na 40 °C ampula je ohlađena, a reakcijska smjesa je prebačena u suvišak smjese acetona i dietil etera (2/1) koja je neotapalo. Nakon centrifugiranja pri 7800 o/min tijekom 5 minuta precipitat je filtriran i pročišćen precipitacijom iz metanola u smjesu neotapala. Kopolimer je filtriran i osušen pod vakuumom (2,12 g, 44 %). Za uklanjanje ditiobenzoatne krajnje skupine, 2,12 g međuproducta kopolimera, 1,4-dioksan i 2,2'-Azobisisobutironitril (AIBN) (320 mg) su otopljeni u DMA (17 mL), preliveni u staklenu ampulu, propuhani argonom i zatvoreni. Nakon 3 sata u termostatiranoj vodenoj kupelji na 80 °C ampula je ohlađena, a otopina je izolirana precipitacijom u suvišak smjese acetona i dietil etera (2/1). Nakon provedbe opisanog postupka pročišćavanja talog je odfiltriran i osušen pod vakuumom te je dobiven kopolimer (1,96 g, 92,5 %). (M_n : 19,700 g/mol, M_w : 21,800 g/mol, \bar{D} : 1,10).

Konačni kopolimerni prekursor priređen je aminolizom TT skupina pomoću hidrazin monohidrata. 1,9 g poli(HPMA-*co*-MA-AP-TT-*co*-MA-AH-kolesterola) otopljeno je u 15,7 mL suhog metanola i držano u atmosferi argona tijekom 20 minuta. Otopina polimera je uz brzo miješanje prebačena u otopinu 267 μ L hidrazin monohidrata (5,5 mmol) u 2 mL suhog metanola. Uzorak je nakon miješanja preko noći koncentriran na 12 mL i pročišćen pomoću Sephadex LH-20 kolone uz ispiranje metanolom i UV detekciju. Sakupljena frakcija je koncentrirana pod vakuumom, izolirana precipitacijom u suvišak etilacetata i osušena pod vakuumom (1,4 g; 73 %). (5,4 mol. % hidrazidnih skupina; 1,8 mol. % kolesterola; M_n : 18,900 g/mol, M_w : 20,700 g/mol, \bar{D} : 1,10)

3.1.3. Sinteza polimernog konjugata za pripremu nanočestice RNP-H

Konjugat je priređen reakcijom 1,36 g (0,5 mmol hidrazidnih skupina) polimernog prekursora s TEMPONE radikalom (60,2 mg, 0,47 mmol) preko noći. Prekursor i radikal su otopljeni u 11 mL suhog metanola, a nakon toga je dodana octena kiselina (450 μ L). Nakon miješanja pri sobnoj temperaturi tijekom 20 sati polimerni konjugat je pročišćen pomoću Sephadex LH-20 kolone uz ispiranje metanolom i UV detekciju. Sakupljena frakcija je koncentrirana pod vakuumom, izolirana precipitacijom u suvišak dietil etera i osušena pod vakuumom (1,3 g; iskorištenje: 89%). (0,94 mol. % TEMPONE; M_n : 18,100 g/mol, M_w : 22,100 g/mol, D : 1,20)



Slika 4. Shematski prikaz sinteze polimernog konjugata za pripremu nanočestice RNP-H.

3.1.4. Sinteza polimernog prekursora za pripravu uzorka s peptidnom vezom

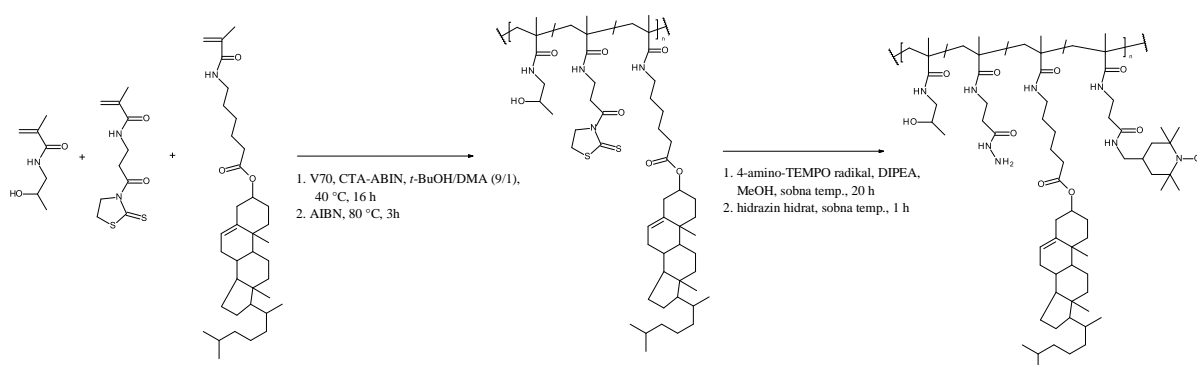
Statistički kopolimerni prekursor koji sadrži HPMA, MA- β -Ala-TT i hidrofobni kolesterol priređen je polimerizacijom s povrativim prijenosom lančane reakcije (RAFT), uz 4-cijano-4-(tiobenzoil)pentansku kiselinu (CTA-AIBN) kao sredstvo za prijenos lanca i 2,2'-azobis(4-metoksi-2,4-dimetilvaleronitril) V-70 kao inicijator u molarnom omjeru 350/2/1 (monomer/CTA-AIBN/V-70). Molarni omjer monomera HPMA/MA- β -Ala-TT/MA-AH-kolesterol bio je 88/10/2 uz 7,8 mol. % tiazolidin-2-tionskih (TT) skupina i 1,8 mol. % kolesterola. Polimerizacija je provedena u smjesi *t*-butanol/DMA (9/1) pri 40 °C tijekom 16 sati, a ditiobenzoatna krajnja skupina uklonjena je kao što je prethodno opisano.⁴³

Detaljan postupak sinteze:

HPMA (2,65 g, 18,5 mmol), MA-Acap-kolesterol (238,4 mg, 0,42 mmol) i CTA-AIBN (26,5 mg, 120 μ mol) otopljeni su u *t*-butanolu (27 mL) i pomiješani s otopinom MA- β -Ala-TT (542,5 mg, 2,1 mmol) i V-70 (18,49 mg, 60 μ mol) u DMA (3 mL). Reakcijska smjesa prelivena je u staklenu ampulu, propuhana argonom i zatvorena. Nakon 16 sati u termostatiranoj vodenoj kupelji na 40 °C ampula je ohlađena, a reakcijska smjesa je prebačena u suvišak smjese acetona i dietil etera (2/1) koja je neotapalo. Nakon centrifugiranja pri 7800 o/min tijekom 5 minuta precipitat je filtriran i pročišćen reprecipitacijom iz metanola u smjesu neotapala. Kopolimer je filtriran i osušen pod vakuumom (1,91 g, 57 %). Za uklanjanje ditiobenzoatne krajnje skupine 1,91 g međuprodukta kopolimera, 1,4-dioksan i 2,2'-Azobisizobutironitril (AIBN) (212 mg) su otopljeni u DMA (11 mL), prelive u staklenu ampulu, propuhani argonom i zatvoreni. Nakon 3 sata u termostatiranoj vodenoj kupelji na 80 °C ampula je ohlađena, a otopina je izolirana precipitacijom u suvišak smjese acetona i dietil etera (2/1). Nakon provedbe opisanog postupka pročišćavanja talog je odfiltriran i osušen pod vakuumom te je dobiven kopolimer (1,2 g, 82%). (M_n : 33,100 g/mol, M_w : 34,800 g/mol, D : 1,05)

3.1.5. Sinteza polimernog konjugata za pripravu nanočestice RNP-P

Konjugat je priređen u dva koraka: prvo je izvedena aminoliza reakcijom 1,15 g (0,3 mmol TT skupina) kopolimernog prekursora i 4 mol. % 4-amino-TEMPO radikala (55,5 mg, 0,32 mmol) preko noći. Otopina TEMPO radikala u 100 μ l suhog metanola dodana je u otopinu polimera (9 ml suhog metanola). Nakon 20 minuta mućkanja dodana je DIPEA (62,2 μ l, 0,35 mmol) te je provedena reakcija na sobnoj temperaturi tijekom 20 sati. Drugi se korak sastojao od dodavanja hidrazin hidrata (15,1 μ L, 0,31 mmol) *in situ* pod jakim magnetskim miješanjem, izbjegavajući bilo kakvo umrežavanje. Nakon 1 sata miješanja polimerni konjugat je pročišćen pomoću Sephadex LH-20 kolone uz ispiranje metanolom i UV detekciju. Sakupljena frakcija je koncentrirana pod vakuumom, izolirana precipitacijom u suvišak dietil etera i osušena pod vakuumom (1,2 g; iskorištenje 98 %). (1,3 mol. % TEMPO; M_n : 18,200 g/mol, M_w : 18,800 g/mol, \bar{D} : 1,03).



Slika 5. Shematski prikaz sinteze polimernog konjugata za pripravu nanočestice RNP-P.

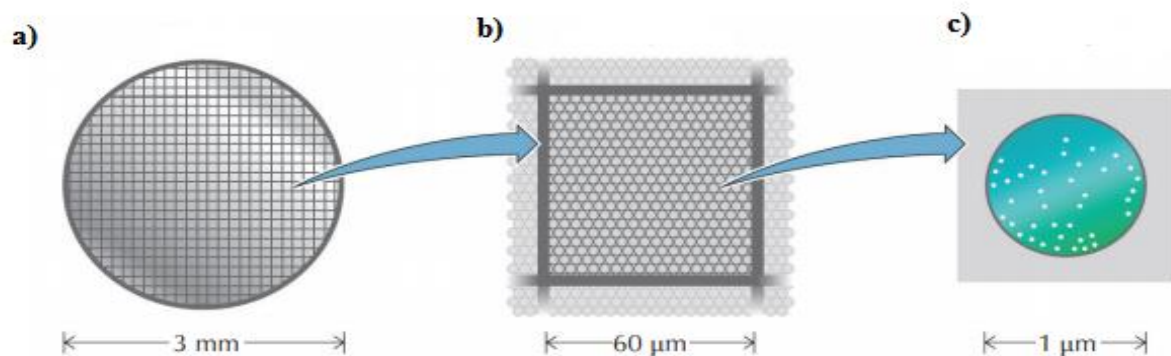
3.1.6. Priprava nanočestica RNP-H i RNP-P

Priređeni polimerni konjugati otopljeni su u puferiranoj otopini fosfatnih soli (engl., *phosphate buffer saline*, PBS) (1,0 mol/dm³) uz miješanje magnetskom mješalicom. pH pufera podešen je pomoću otopina HCl i NaOH te je iznosio 7,4, 6,8, 6,0 i 5,0. Na taj način dobivene su nanočestice RNP-H koje sadrže radikal vezan hidrazonskom vezom te RNP-P na koje je radikal vezan peptidnom vezom.

3.2. METODE

3.2.1. Krio - elektronska mikroskopija (cryo- TEM)

Krio - elektronska mikroskopija je metoda koja uključuje prijenosnu elektronsku mikroskopiju tankog vitrificiranog vodenog filma koji se održava na temperaturi tekućeg dušika.⁴⁴ Otkriće ove tehnike omogućilo je izravno snimanje struktura koje su tvorene od amfifilnih molekula u vodenom okruženju.^{45,46} Pufer debljine oko 0,1 μm , u kojem su raspršene čestice promatranog uzorka, nanosi se na ugljični film koji ima potpornu ulogu (Slika 6., c) To omogućuje vitrifikaciju odnosno brzo zamrzavanje, pri čemu otapalo zadržava amorfnu strukturu bez stvaranja kristala leda koji su uzrok difrakcije zraka elektrona.

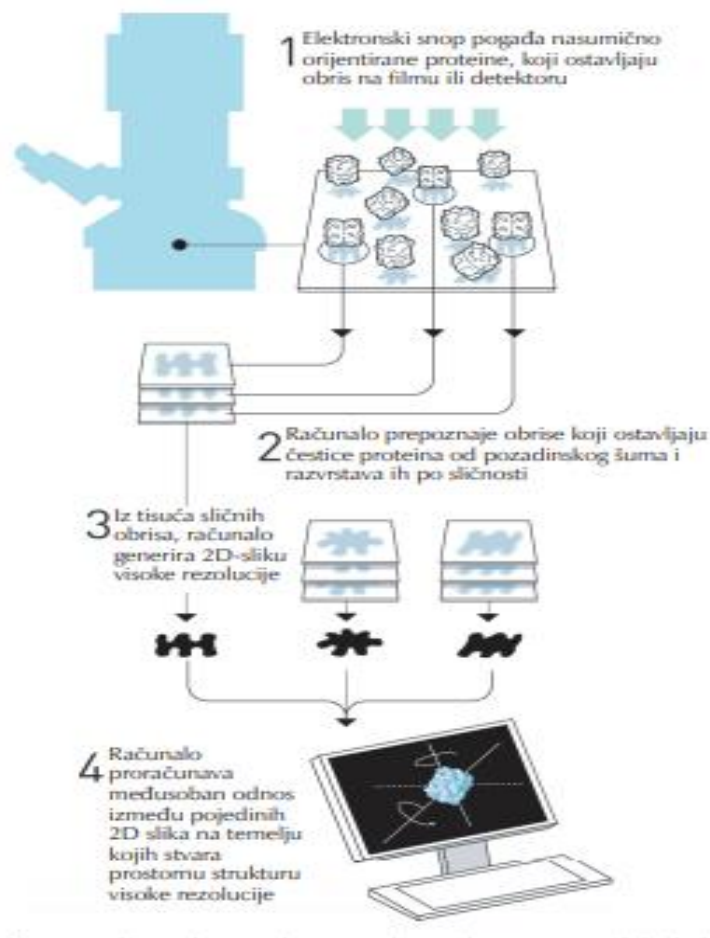


Slika 6. Koraci u pripremi uzoraka za krio-TEM. Preuzeto iz literaturnog navoda 47.

Osim toga, uvjeti u vetrificiranom otapalu pogoduju očuvanju nativnog stanja bioloških membrana, kao i očuvanju samog uzorka. Neelastični sudari i raspršenje elektrona dovode do pucanja kemijskih veza, dok u ovakvim uvjetima atomi i dijelovi struktura ostaju na svojem mjestu pa ne dolazi do narušenja strukture.⁴⁸ S obzirom da su promatrane molekule po svojem sastavu uglavnom tvorene od lakih atoma poput vodika, fosfora, ugljika, dušika i kisika, kao takve daju preslabi kontrast u odnosu na otapalo. Uz to jakost elektronskog snopa mora imati minimalne vrijednosti upravo zbog osjetljivosti biološkog materija.

Slika čestica nastalih u takvim uvjetima bit će mutna, slabog kontrasta i teško prepoznatljiva u odnosu na pozadinu. Zbog tog razloga, prikuplja se nekoliko tisuća slika čestica koje se izoštravaju te orijentiraju u prostoru. Takva se metoda naziva jednočestična analiza.^{49,48}

Valna duljina elektrona ima vrijednost oko 1 pm, dok valna duljina fotona iznosi 1 μm , takve razlike u valnim duljinama omogućuju veliku rezoluciju elektronskog mikroskopa. Iz elektronskog pištolja otpuštaju se elektroni koji se usmjerenom gibaju. Na svom putu do magnetskog polja, koje ih privlači, prolaze kroz uzorak te ostavljaju obris na filmu ili detektoru. Računalo prepoznaje obrise promatranih čestica, a različiti algoritmi sortiraju i tvore slike čestica u istoj orijentaciji. Na kraju software izrađuje konačnu sliku strukture visoke rezolucije, slika 7.



Slika 7. Shematski prikaz jednočestične analize. Prilagođeno iz materijala Švedske kraljevske akademije znanosti.

Priprema uzoraka za krio – elektronsku mikroskopiju

Polimerni konjugati otopljeni su u PBS-u pri pH 7,4 uz miješanje magnetskom mješalicom. Nakon otapanja koncentracija čestica iznosila je 5 mg/mL.

Postupak mikroskopiranja

Krio – TEM mjerenja provedena su korištenjem Tecnai G²Sphera 20 elektronskog mikroskopa (FEI Company, Hillsboro, OR, SAD) opremljenog s Gatan 626 cryo-nosačem uzorka (Gatan, Pleasanton, CA, USA) te LaB₆ elektronskim pištoljem, slika 8.



Slika 8. Krio- elektronski mikroskop na Prvom Medicinskom fakultetu na Karlovom sveučilištu u Pragu.

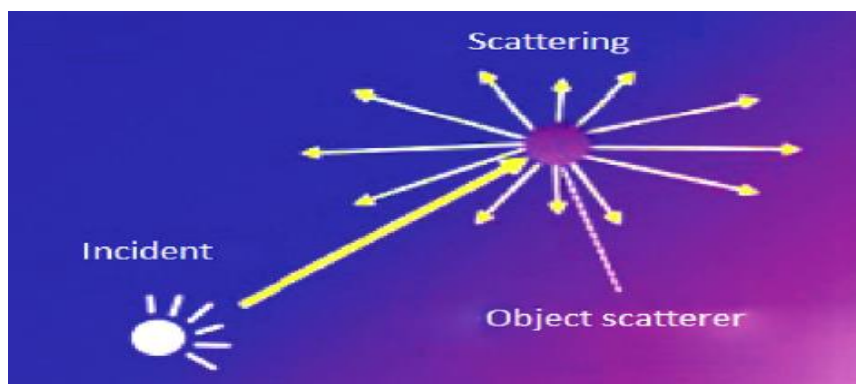
Uzorci su pripremljeni uranjanjem u rashladno sredstvo. 3 μ L otopine naneseo je na elektronsku bakrenu rešetku koja je prekrivena perforiranim ugljikovim filmom.

Takav materijal tvori mrežaste otvore različitih veličina i oblika. Uzorak je izložen jakosti električne energije u vrijednosti od 5 mA u trajanju od 40 s. Većina uzorka uklonjena je postupkom filtriranja u trajanju od 1 s, a zatim je rešetka uronjena u tekući etan na temperaturi od -183 °C. Nakon toga rešetka je prenesena na mikroskop bez zagrijavanja. Slike su snimljene korištenjem akceleriranog napona u vrijednosti od 120 kV, a vrijednosti uvećanja su bile između 11500x i 50000x. Korišten je Gatan UltraScan 1000 slow scan s CCD kamerom u režimu snimanja s malim dozama u kojem broj elektrona ne prelazi 1500 na jedinicu površine 1 nm². Povećanja su omogućila konačnu veličinu piksela u rasponu od 0,2 do 1 nm, a veličina piksela pod fokusom iznosila je između 0,5 i 2,5 μm. Primijenjeni uvjeti uranjanja rezultirali su debljinom uzorka od 100 do 300 nm. Korekcija svjetline i kontrasta slika izvedeni su pomoću ImageJ softvera.

3.2.2 Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS)

Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *Dynamic light scattering*, DLS) je tehnika koja se koristi za mjerenje raspodjele čestica po njihovoj veličini, u koloidnoj suspenziji. Prednosti ove tehnike su brzina, neinvazivnost te mogućnost mjerenja pri niskim koncentracijama čestica.⁵⁰

Zbog valne prirode svjetlosti dolazi do raspršenja, koje predstavlja jedan od načina interakcije materije s elektromagnetskim zračenjem, slika 9.



Slika 9. Prikaz raspršenja svjetlosti. Preuzeto iz literaturnog navoda 50.

Raspršenje svjetlosti na nanočesticama ili makromolekulama manjim od valne duljine upadne svjetlosti slijedi Rayleighev zakon raspršenja, pri čemu ne dolazi do izmjene energije između čestice i zračenja (elastično raspršenje) te ne dolazi do promjene faze fotona prilikom raspršenja.

Dinamičko raspršenje svjetla (DLS), tehnika je srodna fotonskoj korelacijskoj spektroskopiji, koja se temelji na matematičkoj analizi fluktuacije elastično raspršenog zračenja na nanočesticama u koloidnim suspenzijama. Ta tehnika omogućuje *in situ* određivanje veličina, raspodjele veličina i u nekim slučajevima oblika nanočestica u otopinama,⁵¹ bez obzira na zamućenost otopine. To je tehnika koja omogućuje izračun

difuzijskih koeficijenata povezanih s Brownovim kretanjem čestica dispergiranih u tekućem mediju.

Matematička analiza fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti, do koje dolazi zbog Brownovog kretanja čestica uzrokovanog nasumičnim sudarima čestica s molekulama otapala naziva se analizom kumulanti (cumulant analysis) autokorelacijske funkcije mjenenog signala. Analizom kumulanti dolazi se do karakterističnog vremena fluktuacije, direktno povezanog s difuzijskim koeficijentom čestica. Koeficijent translacijske difuzije (D) je obrnuto proporcionalno povezan s njihovim veličinama (polumjerima), kao što prikazuje Stokes-Einsteinova jednadžba:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (1)$$

T predstavlja temperaturu uzorka, η viskoznost medija, k Boltzmannovu konstantu, a R_h je hidrodinamički radijus promatrane čestice⁵¹ koji predstavlja efektivni polumjer čestice u otopini koji uključuje i molekule otapala u neposrednoj blizini čestice.⁵² Definira se kao polumjer čvrste sfere koje difundira istom brzinom kao molekula ili čestica koja se mjeri. Ovisi o ionskoj jakosti, strukturi površine čestice te obliku čestice. Jednadžba (4) je primjenjiva na sferne čestice koje ne ulaze u međusobnu interakciju. Dakle, DLS tehnikom određuje se koeficijent translacijske difuzije dok se hidrodinamički radijus izračunava uz pretpostavku oblika čestice.

Softver za obradu DLS podataka korišten u ovom radu koristi algoritme koji omogućuju određivanje hidrodinamičkog polumjera iz raspodjele koja može biti multimodalna empirijska, ili teoretska log-normalna. U potonjem slučaju moguće je izraziti indeks polidisperznosti (PDI) koji predstavlja omjer standardne devijacije i srednje vrijednosti izračunate iz log-normalne raspodjele. Obje raspodjele po veličini čestice mogu biti utegnute prema intenzitetu raspršenog zračenja, volumenu čestice, te njihovom broju. Ova informacija je najčešće tražena jer odražava statistiku prema broju, dok raspodjela utegnuta prema

intenzitetu daje nerealno veći prosječni hidrodinamički radijus, s obzirom da veće čestice više pridonose signalu raspršenog zračenja.

Mjerenje se vrši tako da se uzorak stavlja u kivetu na koju se umjerava laser. Makromolekule/čestice raspršuju svjetlost u različitim smjerovima. Raspršeno svjetlo dolazi do detektora koji je postavljen na 90° u odnosu na lasersku zraku. Detektor registrira broj fotona u ovisnosti o vremenu. Taj se signal prenosi na digitalni signalni procesor, odnosno korelator. Korelatorom se uklanjaju šumovi od signala te se vrši vremenska analiza. Također, korelatorom se vrši konstrukcija vremenske autokorelacijske funkcije $G(\Gamma)$ raspršenog intenziteta, prema jednadžbi:

$$G(\Gamma) = \frac{\langle I(t_0) + I(t_0 + \Gamma) \rangle}{I(t_0)^2} \quad (2)$$

Gdje I predstavlja intenzitet svjetla, $I(t_0)$ intenzitet svjetla u vremenu t_0 , a Γ vremenski interval.

Detektor kontinuirano vrši brojanje fotona u određenom vremenskom intervalu, a korelator posjeduje broj vremenskih intervala povezanih s tim fotonima. S vremenskim odmicanjem dolazi do gubitka korelacije. Gubitak korelacije je eksponencijalan proces u ovisnosti o vremenu. Kad se takva krivulja prebaci u logaritamski oblik dobiva se autokorelacijska funkcija.

Mjerenje metodom DLS

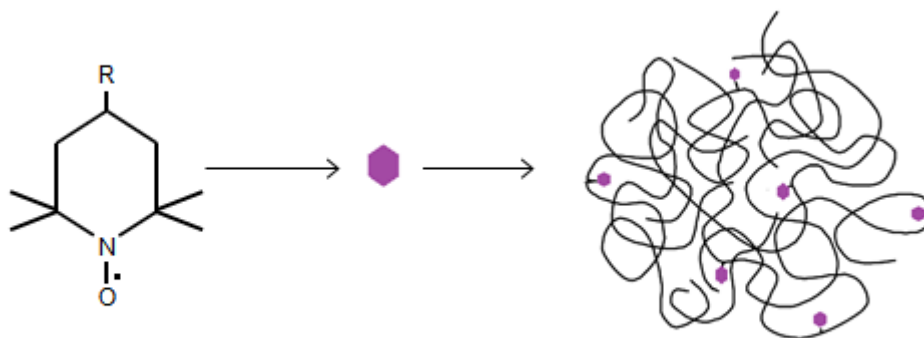
DLS mjerenje provedena su primjenom instrumenta za mjerenje dinamičkog raspršenja svjetla Brookhaven NanoBrook Omni u Laboratoriju za koloide, polielektrolite i međupovršine pri Centru za mikro i nanoznanosti i tehnologije Sveučilišta u Rijeci, slika 10. DLS Eksperimenti provedeni su pri 25 °C.



Slika 10. Instrument za mjerenje dinamičkog raspršenja svjetla Brookhaven NanoBrook Omni u Laboratoriju za koloide, polielektrolite i međupovršine pri Centru za mikro i nanoznanosti i tehnologije Sveučilišta u Rijeci.

3.2.3 Elektronska spinska rezonancija (ESR)

Metoda elektronske spinske rezonancije (ESR) temelji se na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetskih valova kod molekula koje sadrže najmanje jedan nespareni elektron i nalaze se u statičkom magnetskom polju. Prijelazi elektrona između njihovih energijskih razina inducirani su elektromagnetskim zračenjem, a ova tehnika omogućuje detekciju takvih prijelaza.⁵³ Polimerni nosači lijekova najčešće ne sadrže nesparene elektrone pa kako bi se proučavali ovom tehnikom u njih je potrebno ugraditi molekulske radikale. U praksi se najčešće koriste nitroksidni radikali. Stabilnosti slobodnog radikala pridonose četiri metilne skupine koje su supstituirane u α -položajima te tako sterički štite nespareni elektron. U ovom su radu nitroksidni radikali vezani kovalentnom vezom na nosač. Takav način ugradnje naziva se spinska oznaka (engl. *spin label*), slika 11., a omogućuje istraživanje dinamike ovog polimernog nosača.⁵⁴

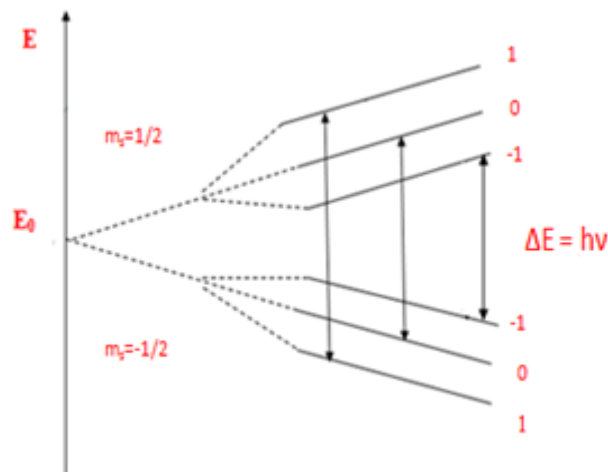


Slika 11. Shematski prikaz ugradnje nitroksidnog radikala u uzorak metodom spinske oznake.

Kad se nitroksidni radikal stavi u magnetsko polje dolazi do interakcije spina elektrona \vec{S} s vanjskim magnetskim poljem \vec{B} kao i ostalim magnetskim momentima. Ta se međudjelovanja opisuju hamiltonijanom:

$$H = \mu_B \vec{B} \vec{g} \vec{S} + \vec{S} \vec{A} \vec{I} \quad (3)$$

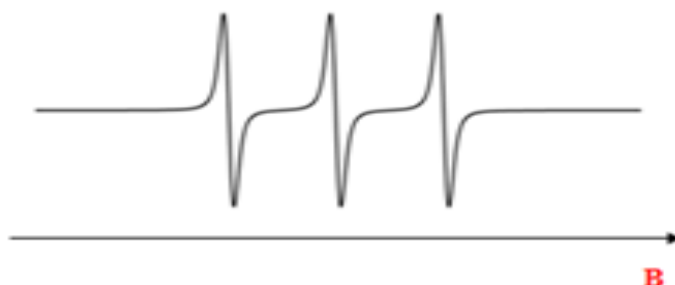
gdje je μ_B Bohrov magneton za elektron, \vec{B} je vanjsko magnetsko polje, \vec{S} je spin elektrona, \vec{I} je spin jezgre dušika, a \vec{g} i \vec{A} su konstantni tenzori drugog ranga. Zeemanova interakcija predstavljena je prvim članom hamiltonijana te opisuje međudjelovanje spina elektrona s vanjskim magnetskim poljem. Zbog jakog međudjelovanja spina elektrona i vanjskog magnetskog polja dolazi do podjele energije spinova elektrona u dvije razine. Slaba interakcija spina elektrona i spina jezgre dušika prikazana je drugim članom hamiltonijana i poznata je pod nazivom hiperfina interakcija. Upravo zbog nje dolazi do dodatnog cijepanja svake Zeemanove razine u tri podrazine, slika 12.



Slika 12. Energijske razine nitroksidnog radikala u statičkom magnetskom polju.

Zbog toga se u ESR spektrima nitroksida mogu uočiti klasične tri apsorpcijske linije u obliku prve derivacije, slika 13.

Ove linije daju informacije o molekularnoj dinamici proučavanog sustava, tj., iz širine, oblika i intenziteta linija moguće je doći do podatka o rotacijskom korelacijskom vremenu (τ_R).⁵⁵



Slika 13. Apsorpcijske linije nitroskida u obliku prve derivacije.

Priprema uzoraka za ESR mjerenja

Uzorak je otopljen u PBS-u, a zatim su namještene različite pH vrijednosti (7,4, 6,8, 6,0 i 5,0.) dodatkom klorovodične kiseline (HCl, $c = 0,1$ M) ili natrijevog hidroksida (NaOH, $c = 0,1$ M) uz miješanje i stalno provjeravanje pomoću pH metra. Koncentracija uzorka u otopinama iznosila je $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$

Mjerenje metodom ESR

ESR mjerenja napravljena su u Laboratoriju za magnetske rezonancije Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, slika 14. Spektrometar Varian E-909 opremljen je konvencionalnim magnetom magnetskog polja $B \sim 0,3$ T, a radna frekvencija uređaja je veličine 10 GHz. Mikrovalni most koji posjeduje spektrometar je Bruker ER O41 XG. Spektri su snimani pri 37 °C, a temperatura uzorka kontrolirana je pomoću temperaturene jedinice Bruker ER 4111 VT.



Slika 14. Spektrometar za elektronsku spinsku rezonanciju u Laboratoriju za magnetske rezonancije Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Uzorci za mjerenje stavljeni su u kapilaru koja je s donje strane zatvorena glinom te smješteni u ESR cjevčicu. Dobiveni spektri su akumulirani na osobnom računalu opremljenom programskom podrškom za prikupljanje i obradu podataka EPRWare EW.

Korelacijska vremena izračunata su prema jednadžbi:⁵⁴

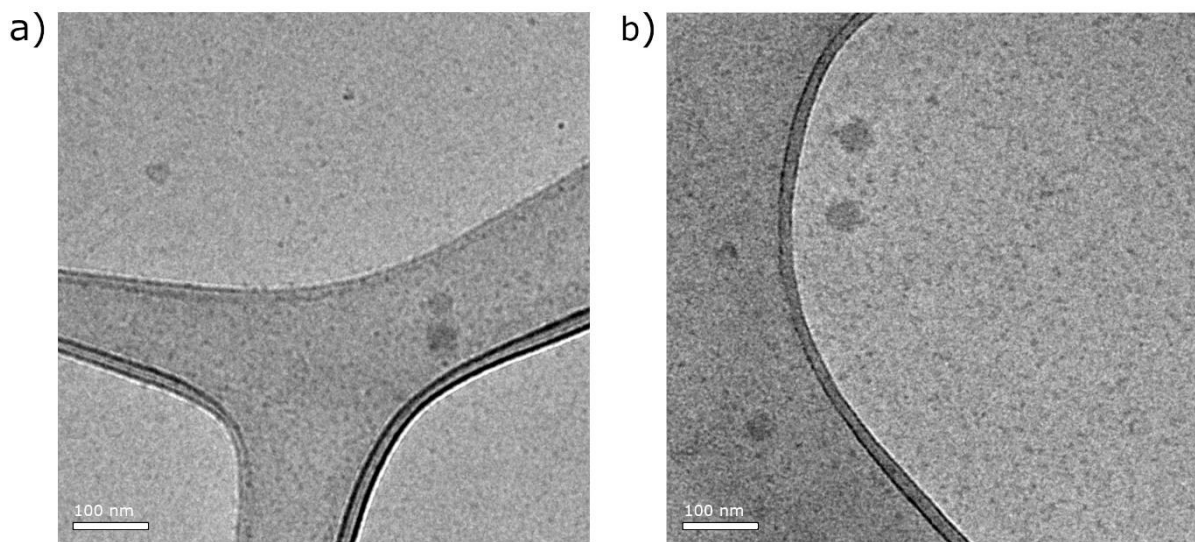
$$\tau_c = 0.65 \times 10^{-9} \Delta B \left(\left[\frac{I(0)}{I(-1)} \right]^{1/2} + \left[\frac{I(0)}{I(+1)} \right]^{1/2} - 2 \right) \quad (4)$$

gdje su $I(-1)$, $I(0)$ i $I(+1)$ intenziteti ESR linija pri nižem, srednjem i višem polju, a ΔB je širina središnje linije.

4. REZULTATI

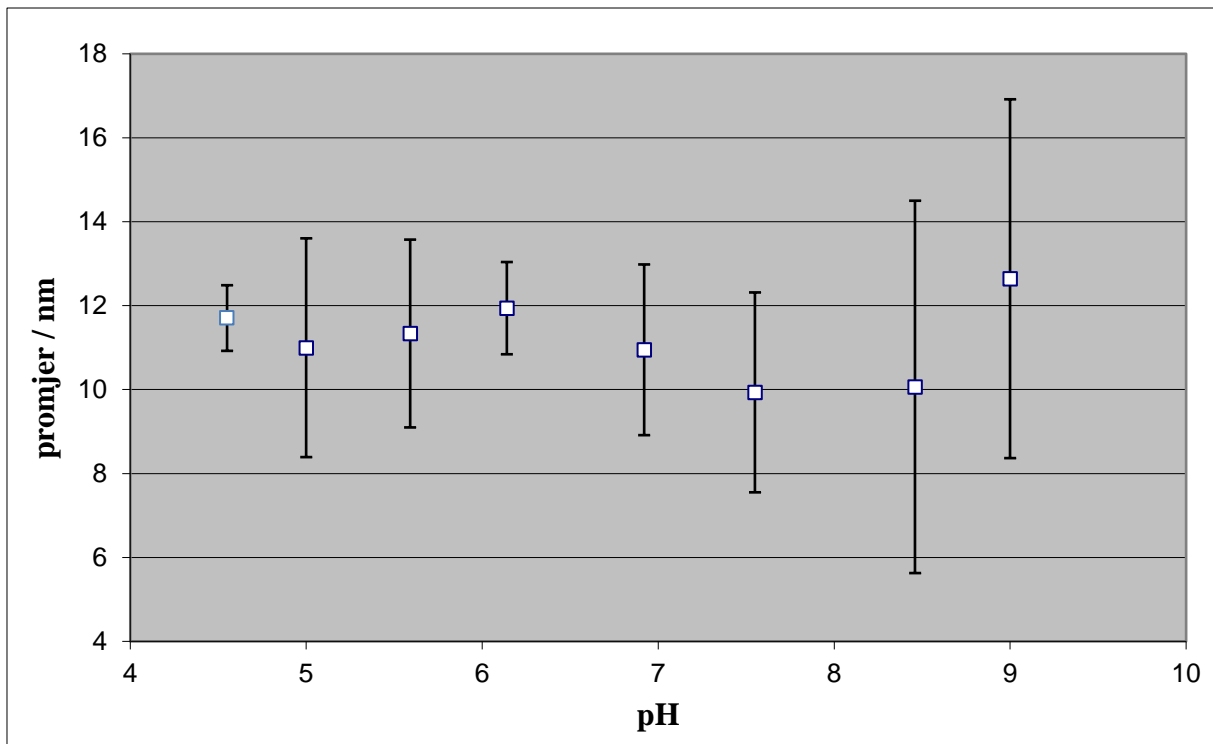
4.1. ODREĐIVANJE MORFOLOGIJE I VELIČINE NANOČESTICA

Na slici 15. prikazane su slike uzoraka nanočestica RNP-H i RNP-P u otopini PBS-a snimljene krio-transmisijom elektronskom mikroskopijom. Vidljivo je da su se priređeni polimerni konjugati otapanjem u fosfatnom puferu oblikovali u dobro definirane sferične nanostrukture prosječne veličine približno 25-50 nm.



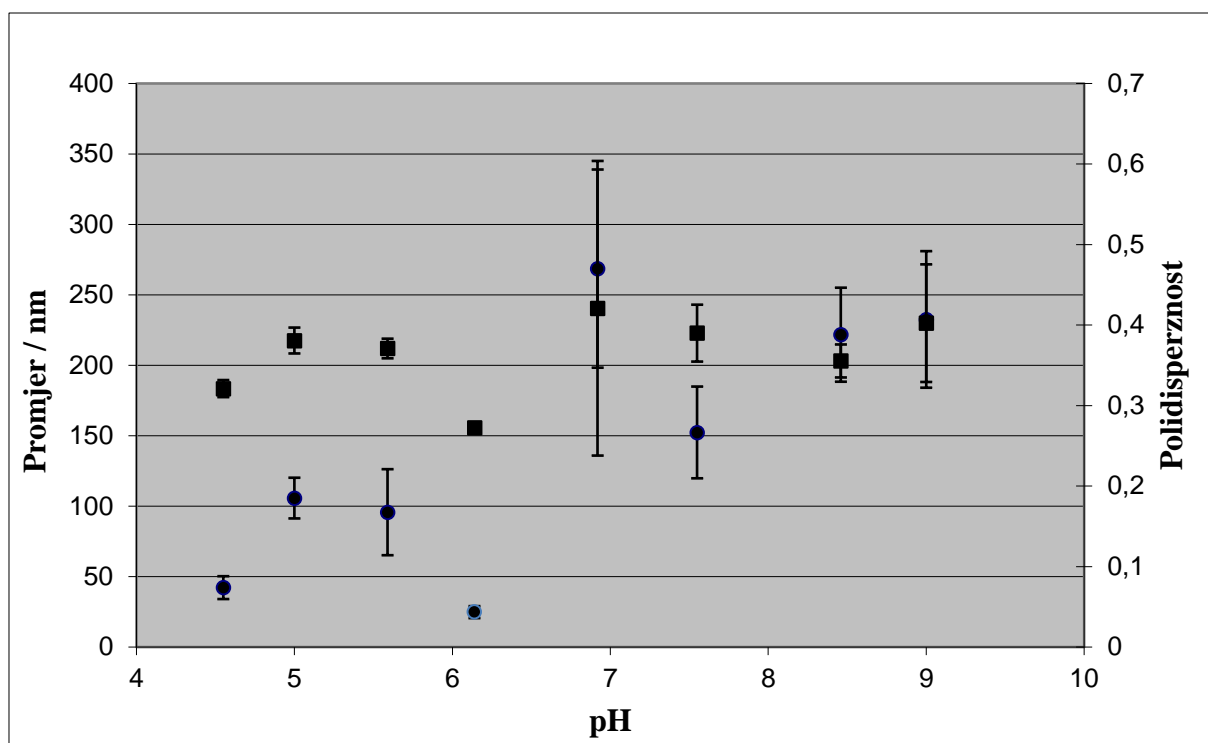
Slika 15. Krio-TEM slike a) RNP-H i b) RNP-P u PBS-u (pH = 7,4).

Slika 16. prikazuje ovisnost promjera nanočestica RNP-P o promjeni pH. Vrijednosti promjera utegnute su prema broju nanočestica u promatranom sustavu. Uočljivo je da veličina promjera ne pokazuje značajan trend u odnosu na promjenu pH, dimenzije nanočestica se ne mijenjaju već se nalaze unutar granica pouzdanosti. Prema ovim mjerenjima, promjer nanočestica je između 10 i 13 nm.



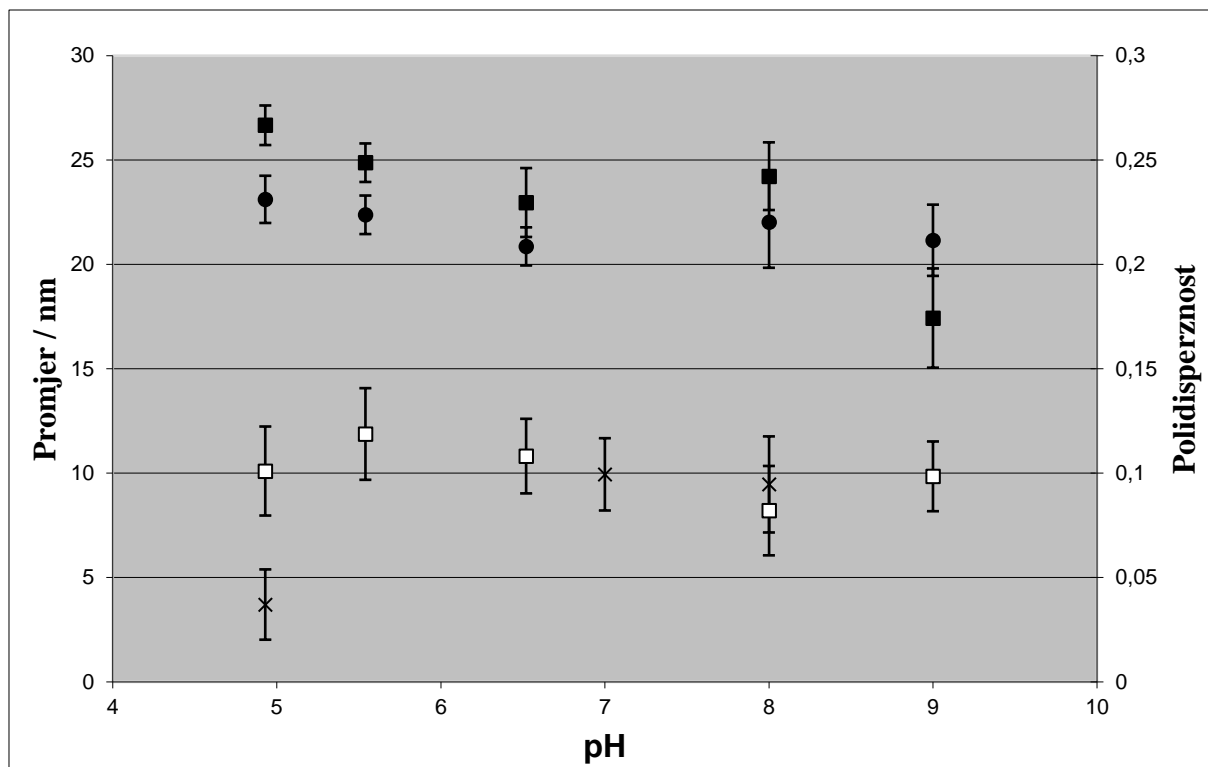
Slika 16. Ovisnost promjera nanočestice RNP-P (utegnute prema broju) o promjeni pH pri 25 °C.

Slika 17. prikazuje ovisnost promjera nanočestica RNP-P o promjeni pH, a vrijednosti promjera utegnute su prema intezitetu kojim nanočestice utječu na raspršenje svjetlosti. Na sekundarnoj y- osi prikazane su vrijednosti polidisperznosti. Vidljivo je da veličina promjera ne pokazuju nikakav trend u odnosu na promjenu pH, dimenzije nanočestica se ne mijenjaju već se nalaze unutar granica pouzdanosti. Prema ovim mjerenjima promjer čestica varira između 20 i 270 nm.



Slika 17. Ovisnost promjera nanočestice RNP-P (utegnute prema intenzitetu) i polidisperznosti o promjeni pH vrijednosti pri 25 °C • polidisperznost ■ vrijednosti utegnute prema intenzitetu.

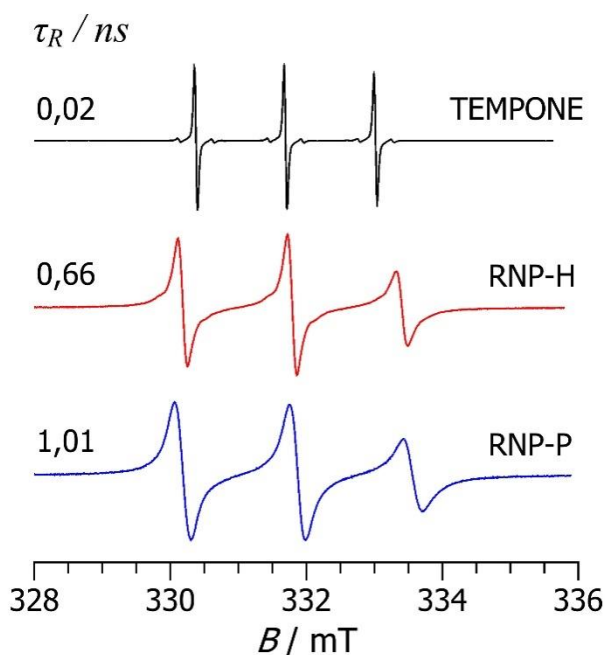
Slika 18. prikazuje ovisnost promjera nanočestica RNP-H o promjeni pH, a vrijednosti promjera utegnute su prema intenzitetu i prema broju. Na sekundarnoj y- osi prikazane su vrijednosti polidisperznosti. Vidljivo je da veličina promjera ne pokazuje značajan trend u odnosu na promjenu pH i nalazi se u vrijednostima između 4 i 27 nm, dimenzije nanočestica se ne mijenjaju već se nalaze unutar granica pouzdanosti. Na grafu su dodane 3 točke (pri pH vrijednostima 4,93 i 7,8) koje predstavljaju promjere utegnute prema broju, na temperaturi od 37 °C.



Slika 18. Ovisnost promjera nanočestice RNP-H (utegnute prema broju i intenzitetu) i polidisperznosti u odnosu na promjenu pH pri 25 °C; ● polidisperznost, ■ vrijednosti utegnute prema intenzitetu, □ vrijednosti utegnute prema broju. Vrijednosti označene s x predstavljaju podatke utegnute prema broju na temperaturi 37°C.

4.2. OTPUŠTANJE NITROKSIDNIH RADIKALA SA NANOČESTICA

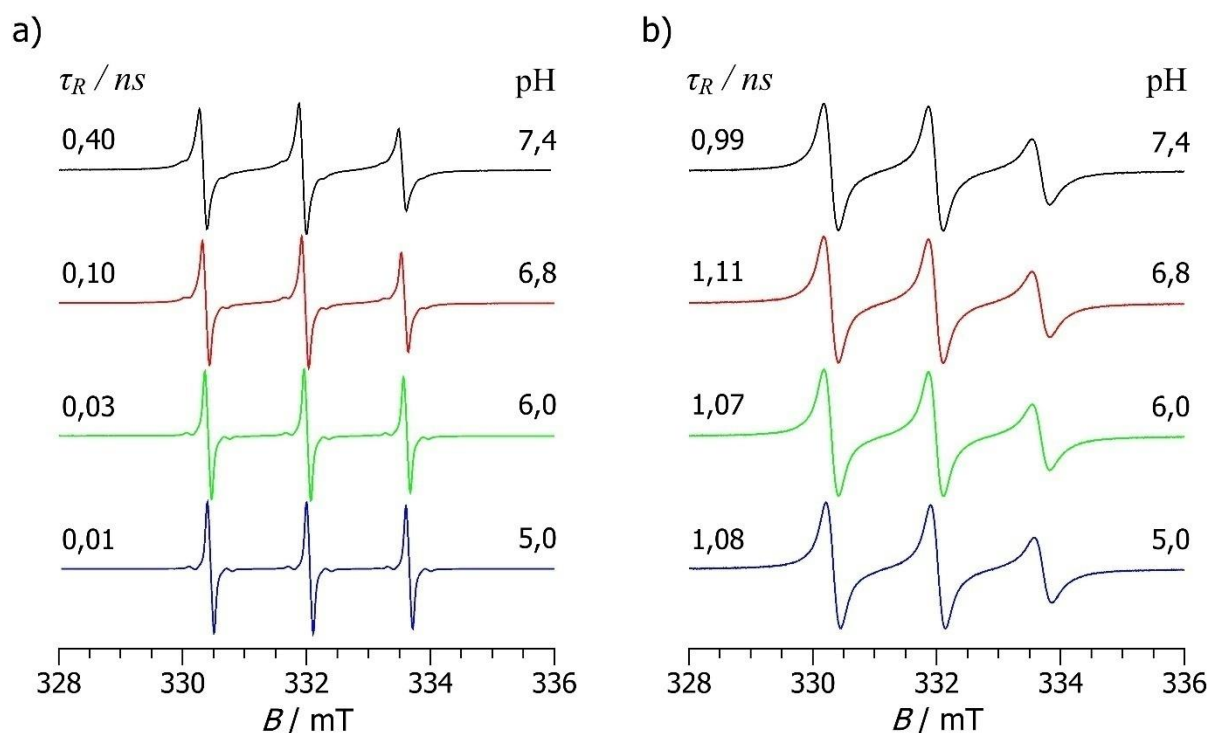
Slika 19. prikazuje ESR spektre slobodnog TEMPONE nitroksidnog radikala i nanočestica RNP-H i RNP-P u PBS-u ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) pri $\text{pH}=7,4$. Spektri su snimani na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. ESR spektar TEMPONE radikala sastoji se od tri vrlo uske linije približno jednakih intenziteta koje su karakteristične za brzo gibanje molekule. Iznimno kratko rotacijsko korelacijsko vrijeme ($0,02 \text{ ns}$) također potvrđuje brzo gibanje radikala u slobodnom stanju. ESR spektri nanočestica RNP-H i RNP-Psu širi od spektra slobodnog radikala te sadrže liniju nižeg intenziteta pri višem polju. Također, zbog sporijeg gibanja korelacijska vremena radikala vezanih za nanočestice znatno su dulja u usporedbi sa slobodnim radikalom.



Slika 19. ESR spektri čistog TEMPONE radikala, RNP-H ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) i RNP-P ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) u PBS-u ($\text{pH}=7,4$) na $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

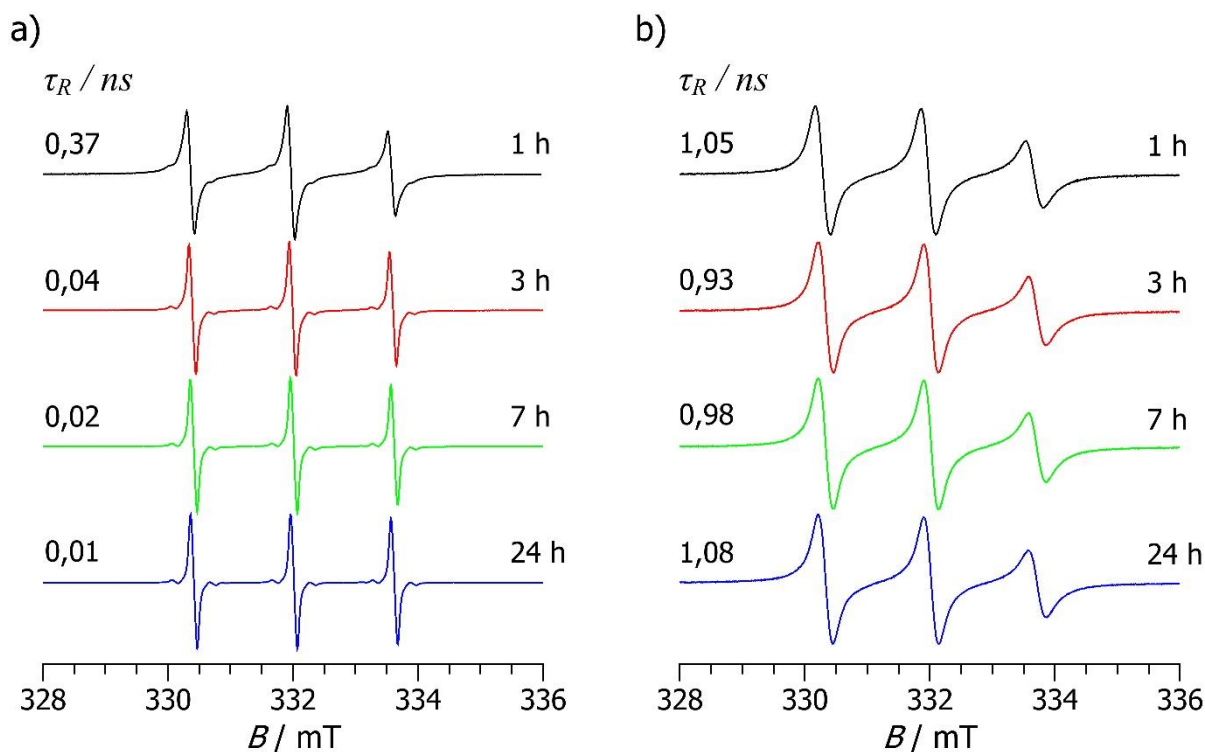
Na slici 20. prikazani su ESR spektri nanočestica RNP-H i RNP-P u PBS-u pri različitim pH vrijednostima nakon 24 sata inkubacije na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Spektri nanočestice RNP-H su uži od spektara RNP-P pri svim pH vrijednostima, a korelacijska vremena su kraća. Pri $\text{pH} = 7,4$ spektar RNP-H sadrži liniju nižeg intenziteta pri višem polju. Snižavanjem pH

vrijednosti dolazi do ubrzavanja mobilnosti nitroksidnog radikala zbog čega se intenzitet ove linije povećava, a korelacijsko vrijeme se smanjuje. Pri pH = 5,0 spektar RNP-H sadrži tri linije približno istog intenziteta usporedive sa spektrom slobodnog TEMPONE radikala, slika 19. Nasuprot tome, ESR spektri nanočestice RNP-P zadržavaju isti oblik pri svim pH vrijednostima, a korelacijska vremena se značajno ne mijenjaju.



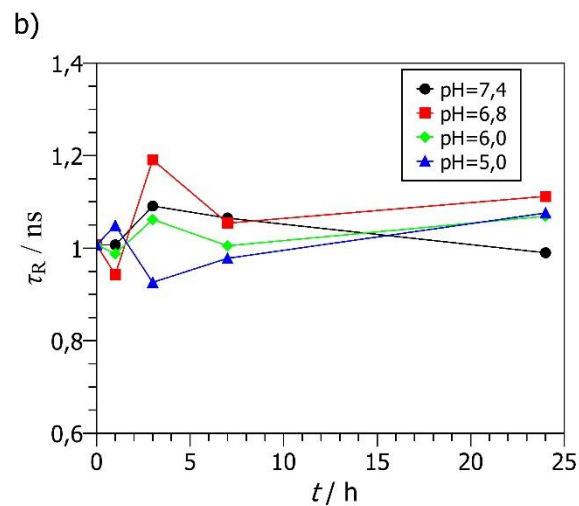
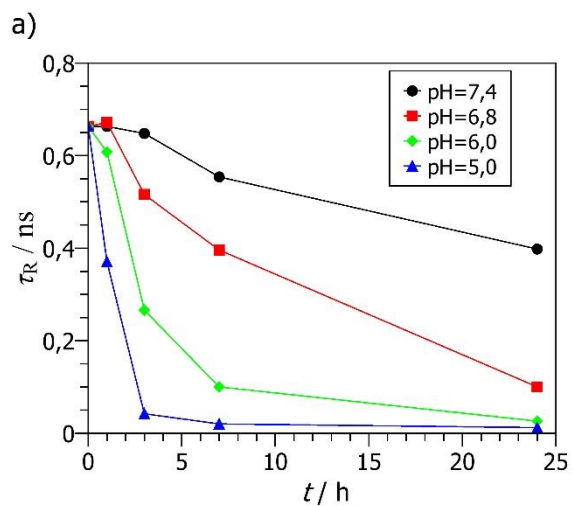
Slika 20. ESR spektri a) RNP-H i b) RNP-P u PBS-u pri različitim pH vrijednostima na 37 °C nakon 24 sata inkubacije.

Slika 21. prikazuje ESR spektre nanočestica RNP-H i RNP-P u PBS-u pri pH = 5,0 nakon različitih vremena inkubacije na 37 °C. ESR spektri nanočestice RNP-H se sužavaju, a korelacijsko vrijeme se znatno smanjuje već nakon tri sata inkubacije. Suprotno tome, kod nanočestice RNP-P ne dolazi do značajne promjene korelacijskih vremena i oblika ESR spektara s vremenom inkubacije.



Slika 21. ESR spektri a) RNP-H i b) RNP-P u PBS-u (pH=5,0) na 37 °C nakon različitih vremena inkubacije.

Ovisnost korelacijskih vremena za nanočestice RNP-H i RNP-P o vremenu inkubacije pri različitim pH vrijednostima prikazana je na slici 22. Korelacijsko vrijeme RNP-H smanjuje se s vremenom inkubacije pri svim pH vrijednostima. Nakon 24 sata inkubacije pri pH = 7,4 korelacijsko vrijeme se smanjuje za 40%. Pri nižim pH vrijednostima smanjenje korelacijskih vremena postaje sve izraženije te nakon 24 sata inkubacije pri pH = 5,0 iznosi 98%. S druge strane, korelacijsko vrijeme RNP-P ostaje približno jednako pri svim pH vrijednostima i nakon 24 sata inkubacije.



Slika 22. Ovisnost korelacijskih vremena a) RNP-H i b) RNP-P o vremenu inkubacije pri različitim pH vrijednostima na 37 °C.

5. RASPRAVA

Sintetizirani su kopolimeri poli[*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamida] (poli(HPMA)) koji sadrže kolesterol i TEMPONE radikal. Micelizacijom odgovarajućih kopolimera u otopini fosfatnog pufera (PBS) priređene su dvije vrste nanočestica u kojima je nitroksidni radikal vezan hidrazonskom (RNP-H) i peptidnom vezom (RNP-P). Krio-transmisijskom elektronskom mikroskopijom pokazano je da su dobivene nanočestice sferičnog oblika prosječne veličine 25–50 nm, slika 15. Podaci o hidrodinamičkom promjeru čestica RNP-P i RNP-H, prikazani u slikama 16, 17. i 18. upućuju na moguću prisutnost većih agregata čestica u proučavanim sustavima. Naime, velika razlika u promjeru utegnutom prema broju i promjeru utegnutom prema intenzitetu, upućuje na prisutnost populacije čestica znatno većeg promjera od onog kojeg bi imale pojedinačne čestice. Potonji promjer se može prepoznati iz podataka utegnutih prema broju čestica i iznosi oko 10-15 nm, no prosječni promjer izračunat iz raspodjele utegnute prema intenzitetu veći je otprilike za faktor 10. Također, polidisperznost izračunata iz podataka utegnutih prema intenzitetu je vrlo visoka, tj. iznad 0,2, što također upućuje na prisutnost agregata. Razlozi agregacije mogu ležati u samoj pripremi uzoraka. Naime, oba uzorka u sebi imaju kolesterol, koji je hidrofoban, a uzorak se pripremao u PBS-u, koji je polarno otapalo. Nakon toga pH se podešavao dodacima HCl-a i NaOH što je rezultiralo većom koncentracijom soli u otopini, a samim time i polarnost otapala je povećana. Također, vrijeme stajanja uzoraka nakon filtracije uzoraka mogla je utjecati na agregaciju ovih sustava. S obzirom na prisutnost agregata, mjerenja pri nekim pH vrijednostima su opetovana nakon filtracije kroz filter veličine pora 200 um, no to nije imalo značajan efekt na izmjeren promjer, s obzirom da su agregati vjerojatno ipak nešto manjih dimenzija. Stoga bi ovakva mjerenja trebalo provesti s različitim vremenskim intervalima da bi se provjerila hipoteza o agregaciji. Naime, ukoliko bi se protokom vremena značajno povećavao promjer čestica kao i polidisperznost, to bi jednoznačno upućivalo na agregaciju.

Metodom elektronske spinske rezonancije ispitana je dinamika priređenih nanočestica u fosfatnom puferu te je uspoređena s dinamikom slobodnog TEMPONE radikala. ESR spektar nitroksidnog radikala sastoji se od tri linije koje nastaju kao posljedica anizotropne hiperfine interakcije između nesparenog elektrona i jezgre dušika, slika 19.⁵⁵ Gibanje radikala u otopini PBS-a je slobodno te dolazi do njegove brze reorijentacije. ESR spektar radikala koji se reorijentira na brzom vremenskoj skali sastoji se od tri uske linije približno istog intenziteta, slika 19. Gibanje radikala može se pratiti pomoću rotacijskog korelacijskog vremena, τ_R , koje predstavlja vrijeme potrebno da se radikal okrene za jedan radijan te ovisi o veličini radikala. Korelacijsko vrijeme za TEMPONE radikal (0,02 ns) odgovara brzom gibanju molekule (između 10^{-11} i 10^{-9} s).⁵⁶ Mobilnost radikala ovisi o lokalnoj viskoznosti i njegovoj povezanosti sa većom, manje mobilnom molekulom. Kada je radikal kovalentno vezan za nanočestice njegova mobilnost je ograničena te ovisi o pokretljivosti lanca kojim je povezan i o ukupnom gibanju nanočestice. Zbog toga su ESR spektri nanočestica RNP-H i RNP-P širi od spektra čistog TEMPONE radikala te sadrže linije različitih intenziteta. Slične ESR spektre dobili su Li i suradnici proučavajući nanočestice temeljene na telodendrimerima koje na površini sadrže polietilenglikol (PEG).⁵⁷ Izračunato korelacijsko vrijeme za nanočesticu RNP-H (0,66 ns) je nešto niže od vrijednosti τ_R za nanočesticu RNP-P (1,01 ns). Rotacijska mobilnost nitroksidnog radikala u ispitivanim nanočesticama pretežno je omogućena zbog prisutnosti dvije metilenske skupine u razmaknici kojom je radikal vezan za nanočestice. Dulje korelacijsko vrijeme nitroksidnog radikala u nanočestici RNP-P može se objasniti nemogućnošću rotacije oko peptidne veze prisutne u razmaknici u usporedbi s hidrazonskom vezom. Da bi se ispitala promjena u mobilnosti TEMPONE radikala pri različitim pH vrijednostima (7,4–5,0) nanočestice su inkubirane u odgovarajućim otopinama pufera tijekom 24 sata. U fiziološkim uvjetima (pH=7,4) oblik ESR spektra RNP-H, slika 20a, kao i odgovarajuće korelacijsko vrijeme (0,40 ns) ne razlikuju se značajno od spektra

snimljenog prije inkubacije. Zbog toga se može zaključiti da se nitroksidni radikal u fiziološkim uvjetima ne otpušta s nanočestice RNP-H u značajnoj količini. Snižavanjem pH vrijednosti ESR spektar se sužava, a korelacijsko vrijeme se smanjuje. Pri pH = 5,0 koji odgovara uvjetima u tumorskim stanicama spektar RNP-H sastoji se od tri linije gotovo istog intenziteta te je jednak spektru slobodnog TEMPONE radikala. Izračunato korelacijsko vrijeme (0,01 ns) potvrđuje da se radikal slobodno giba u otopini pufera te više nije vezan za nanočesticu. Suprotno tome, oblik ESR spektra RNP-P ne mijenja se bez obzira na uvjete inkubacije, a odgovarajuća korelacijska vremena potvrđuju da nije došlo do promjene u gibanju radikala, slika 20b. Stoga se može zaključiti da je radikal ostao vezan na nanočestici. Također je ispitano otpuštanje radikala s nanočesticama u kiselim uvjetima nakon različitih vremena inkubacije. Vidljivo je da se ESR spektar RNP-H značajno sužava već nakon 3 sata inkubacije, a korelacijsko vrijeme se smanjuje preko 16 puta, slika 21a. Duljim trajanjem inkubacije ne dolazi do značajne promjene oblika ESR spektara i korelacijskih vremena pa se može zaključiti da su već nakon tri sata gotovo svi radikali prešli u otopinu pufera. Nasuprot tome, kod nanočestice RNP-P ne opaža se promjena oblika spektara, a korelacijska vremena su približno jednaka bez obzira na vrijeme trajanja inkubacije, slika 21b. Slika 22. prikazuje ovisnost korelacijskih vremena za obje vrste nanočestica o vremenu inkubacije pri različitim pH vrijednostima. Smanjenje korelacijskih vremena RNP-H s trajanjem inkubacije najmanje je kod pH=7,4. Snižavanjem pH vrijednosti primjećuje se nagli pad korelacijskih vremena koji kod pH=5,0 već nakon 3 sata inkubacije iznosi oko 94%, slika 22a. Nakon 24 sata inkubacije pri pH=6,0 i 5,0 gotovo svi radikali prelaze s nanočesticama u otopinu. Zhou i suradnici proučavali su otpuštanje antitumorskog lijeka doksorubicina vezanog hidrazonskom vezom s nanočesticama temeljenih na poli[N-(2-hidroksipropil)metakrilamidu] i β -sitosterolu. Utvrdili su da su nanočestice stabilne pri pH=7,4 dok se pri pH=5,0 s nanočesticama brzo

oslobađa 80% lijeka.⁵⁸ U slučaju nanočestice RNP-P, slika 22b, nije opažena značajna promjena korelacijskih vremena s vremenom inkubacije bez obzira na pH vrijednost.

Rezultati dobiveni istraživanjem pokazuju da je hidrazonska veza pogodna za pripravu konjugata nanočestica kada je potrebno oslobađanje radikala u kiselim uvjetima kakvi vladaju u tumorskim stanicama. S druge strane, peptidna veza je izrazito stabilna te se ne može hidrolizirati čak ni u blago kiseljoj sredini tijekom 24 sata.

6. ZAKLJUČAK

Priređene su dvije vrste nanočestica koje se temelje na polimeru poli[*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamidu] i kolesterolu te sadrže nitroksidni radikal vezan peptidnom ili pH-ovisnom hidrazonskom vezom. Ustanovljeno je da u kiseloj sredini koja je karakteristična za tumorsko tkivo dolazi do otpuštanja radikala vezanih hidrazonskom vezom dok nanočestice koje sadrže radikale vezane peptidnom vezom ostaju stabilne. Suprotno tome, u fiziološkim uvjetima ne dolazi do značajnog oslobađanja radikala ni sa jedne vrste nanočestica.

Ovim istraživanjem pokazano je da se polimerne nanočestice mogu koristiti kao nosači nitroksidnih radikala u novom pristupu terapiji tumora kada se žele izbjeći neželjene nuspojave slobodnih radikala i produljiti njihovo zadržavanje u organizmu.

7. LITERATURA

- (1) Ganesh Kumar, C.; Poornachandra, Y.; Pombala, S. Therapeutic Nanomaterials: From a Drug Delivery Perspective. In *Nanostructures for Drug Delivery*; Elsevier, 2017; pp 1–61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46143-6.00001-4>.
- (2) Zhang, L.; Gu, F.; Chan, J.; Wang, A.; Langer, R.; Farokhzad, O. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clin Pharmacol Ther* **2008**, *83* (5), 761–769. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100400>.
- (3) Brannon-Peppas, L.; Blanchette, J. O. Nanoparticle and Targeted Systems for Cancer Therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56* (11), 1649–1659. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.02.014>.
- (4) Kawasaki, E. S.; Player, A. Nanotechnology, Nanomedicine, and the Development of New, Effective Therapies for Cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2005**, *1* (2), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.03.002>.
- (5) Xu, H.; Meng, F.; Zhong, Z. Reversibly Crosslinked Temperature-Responsive Nano-Sized Polymersomes: Synthesis and Triggered Drug Release. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (24), 4183. <https://doi.org/10.1039/b901141b>.
- (6) Bertrand, N.; Wu, J.; Xu, X.; Kamaly, N.; Farokhzad, O. C. Cancer Nanotechnology: The Impact of Passive and Active Targeting in the Era of Modern Cancer Biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 2–25. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>.
- (7) Blanco, E.; Hsiao, A.; Mann, A. P.; Landry, M. G.; Meric-Bernstam, F.; Ferrari, M. Nanomedicine in Cancer Therapy: Innovative Trends and Prospects. *Cancer Science* **2011**, *102* (7), 1247–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01941.x>.
- (8) Bamrungsap, S.; Zhao, Z.; Chen, T.; Wang, L.; Li, C.; Fu, T.; Tan, W. Nanotechnology in Therapeutics: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System. *Nanomedicine* **2012**, *7* (8), 1253–1271. <https://doi.org/10.2217/nmm.12.87>.

- (9) Rühle, M.; Max-Planck-Institut für Metallforschung. *European White Book on Fundamental Research in Materials Science*; Max-Planck-Institut für Metallforschung: Stuttgart, 2002.
- (10) Wilczewska, A. Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Car, H. Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Pharmacological Reports* **2012**, *64* (5), 1020–1037. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5).
- (11) Rs, S. M. Colloids: Incredible Particles with Plausible Biomedical and Agro-Environmental Applications. *RDMS* **2018**, *6* (4). <https://doi.org/10.31031/RDMS.2018.06.000643>.
- (12) Peer, D.; Park, E. J.; Morishita, Y.; Carman, C. V.; Shimaoka, M. Systemic Leukocyte-Directed siRNA Delivery Revealing Cyclin D1 as an Anti-Inflammatory Target. *Science* **2008**, *319* (5863), 627–630. <https://doi.org/10.1126/science.1149859>.
- (13) Gabizon, A. A. Pegylated Liposomal Doxorubicin: Metamorphosis of an Old Drug into a New Form of Chemotherapy. *Cancer Investigation* **2001**, *19* (4), 424–436. <https://doi.org/10.1081/CNV-100103136>.
- (14) Lasic, D.; Papahadjopoulos, D. Liposomes Revisited. *Science* **1995**, *267* (5202), 1275–1276. <https://doi.org/10.1126/science.7871422>.
- (15) Hamilton, A.; Biganzoli, L.; Coleman, R.; Mauriac, L.; Hennebert, P.; Awada, A.; Nooij, M.; Beex, L.; Piccart, M.; Van Hoorebeeck, I.; Bruning, P.; de Valeriola, D. EORTC 10968: A Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of Polyethylene Glycol Liposomal Doxorubicin (Caelyx®, Doxil®) at a 6-Week Interval in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Annals of Oncology* **2002**, *13* (6), 910–918. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf157>.

- (16) He, J.; Zhao, Y. Light-Responsive Polymer Micelles, Nano- and Microgels Based on the Reversible Photodimerization of Coumarin. *Dyes and Pigments* **2011**, *89* (3), 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2010.03.032>.
- (17) Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. Block Copolymer Micelles for Drug Delivery: Design, Characterization and Biological Significance. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *47* (1), 113–131. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00124-1).
- (18) Pişkin, E. Molecularly Designed Water Soluble, Intelligent, Nanosize Polymeric Carriers. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *277* (1–2), 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.06.003>.
- (19) Schneider, C. S.; Xu, Q.; Boylan, N. J.; Chisholm, J.; Tang, B. C.; Schuster, B. S.; Henning, A.; Ensign, L. M.; Lee, E.; Adstamongkonkul, P.; Simons, B. W.; Wang, S.-Y. S.; Gong, X.; Yu, T.; Boyle, M. P.; Suk, J. S.; Hanes, J. Nanoparticles That Do Not Adhere to Mucus Provide Uniform and Long-Lasting Drug Delivery to Airways Following Inhalation. *Science Advances* **2017**, *3* (4), e1601556. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1601556>.
- (20) Cheng, R.; Feng, F.; Meng, F.; Deng, C.; Feijen, J.; Zhong, Z. Glutathione-Responsive Nano-Vehicles as a Promising Platform for Targeted Intracellular Drug and Gene Delivery. *Journal of Controlled Release* **2011**, *152* (1), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.030>.
- (21) Soppimath, K. S.; Tan, D. C.-W.; Yang, Y.-Y. PH-Triggered Thermally Responsive Polymer Core-Shell Nanoparticles for Drug Delivery. *Adv. Mater.* **2005**, *17* (3), 318–323. <https://doi.org/10.1002/adma.200401057>.
- (22) Lee, K. S.; Chung, H. C.; Im, S. A.; Park, Y. H.; Kim, C. S.; Kim, S.-B.; Rha, S. Y.; Lee, M. Y.; Ro, J. Multicenter Phase II Trial of Genexol-PM, a Cremophor-Free, Polymeric

- Micelle Formulation of Paclitaxel, in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2008**, *108* (2), 241–250. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9591-y>.
- (23) Lee, C. C.; MacKay, J. A.; Fréchet, J. M. J.; Szoka, F. C. Designing Dendrimers for Biological Applications. *Nat Biotechnol* **2005**, *23* (12), 1517–1526. <https://doi.org/10.1038/nbt1171>.
- (24) Svenson, S. Dendrimers as Versatile Platform in Drug Delivery Applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *71* (3), 445–462. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.023>.
- (25) Yao, H.; Veine, D. M.; Fay, K. S.; Staszewski, E. D.; Zeng, Z.-Z.; Livant, D. L. The PHSCN Dendrimer as a More Potent Inhibitor of Human Breast Cancer Cell Invasion, Extravasation, and Lung Colony Formation. *Breast Cancer Res Treat* **2011**, *125* (2), 363–375. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0826-y>.
- (26) Byrne, J. D.; Betancourt, T.; Brannon-Peppas, L. Active Targeting Schemes for Nanoparticle Systems in Cancer Therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (15), 1615–1626. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.005>.
- (27) Byrne, J. D.; Betancourt, T.; Brannon-Peppas, L. Active Targeting Schemes for Nanoparticle Systems in Cancer Therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (15), 1615–1626. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.005>.
- (28) Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.; Shin, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical Cancer Research* **2008**, *14* (5), 1310–1316. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1441>.
- (29) Bamrungsap, S.; Zhao, Z.; Chen, T.; Wang, L.; Li, C.; Fu, T.; Tan, W. Nanotechnology in Therapeutics: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System. *Nanomedicine* **2012**, *7* (8), 1253–1271. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.87>.

- (30) Betancourt, T.; Byrne, J. D.; Sunaryo, N.; Crowder, S. W.; Kadapakkam, M.; Patel, S.; Casciato, S.; Brannon-Peppas, L. PEGylation Strategies for Active Targeting of PLA/PLGA Nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res.* **2009**, *91A* (1), 263–276. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32247>.
- (31) Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense: *World Allergy Organization Journal* **2012**, *5* (1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.
- (32) Brasch, R.; Nitecki, D.; Brant-Zawadzki, M.; Enzmann, D.; Wesbey, G.; Tozer, T.; Tuck, L.; Cann, C.; Fike; Sheldon, P. Brain Nuclear Magnetic Resonance Imaging Enhanced by a Paramagnetic Nitroxide Contrast Agent: Preliminary Report. *American Journal of Roentgenology* **1983**, *141* (5), 1019–1023. <https://doi.org/10.2214/ajr.141.5.1019>.
- (33) Soule, B. P.; Hyodo, F.; Matsumoto, K.; Simone, N. L.; Cook, J. A.; Krishna, M. C.; Mitchell, J. B. Therapeutic and Clinical Applications of Nitroxide Compounds. *Antioxidants & Redox Signaling* **2007**, *9* (10), 1731–1744. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1722>.
- (34) Suy, S.; Mitchell, J. B.; Samuni, A.; Mueller, S.; Kasid, U. Nitroxide Tempo, a Small Molecule, Induces Apoptosis in Prostate Carcinoma Cells and Suppresses Tumor Growth in Athymic Mice. *Cancer* **2005**, *103* (6), 1302–1313. <https://doi.org/10.1002/cncr.20898>.
- (35) Chuan, Y.; Pang, S.-T.; Bergh, A.; Norstedt, G.; Pousette, A. Androgens Induce CD-9 in Human Prostate Tissue. *Int J Androl* **2005**, *28* (5), 291–296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00552.x>.
- (36) Mitchell, J. B.; Xavier, S.; DeLuca, A. M.; Sowers, A. L.; Cook, J. A.; Krishna, M. C.; Hahn, S. M.; Russo, A. A Low Molecular Weight Antioxidant Decreases Weight and

- Lowers Tumor Incidence. *Free Radical Biology and Medicine* **2003**, *34* (1), 93–102.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01193-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01193-0).
- (37) Schubert, R. Cancer Chemoprevention by the Antioxidant Tempol in Atm-Deficient Mice. *Human Molecular Genetics* **2004**, *13* (16), 1793–1802.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddh189>.
- (38) Gueven, N.; Luff, J.; Peng, C.; Hosokawa, K.; Bottle, S. E.; Lavin, M. F. Dramatic Extension of Tumor Latency and Correction of Neurobehavioral Phenotype in Atm-Mutant Mice with a Nitroxide Antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine* **2006**, *41* (6), 992–1000. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.06.018>.
- (39) Saito, K.; Kazama, S.; Tanizawa, H.; Ito, T.; Tada, M.; Ogata, T.; Yoshioka, H. ESR Imaging on a Solid-Tumor-Bearing Mouse Using Spin-Labeled Dextran. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2001**, *65* (4), 787–794.
<https://doi.org/10.1271/bbb.65.787>.
- (40) Chytil, P.; Etrych, T.; Kříž, J.; Šubr, V.; Ulbrich, K. N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide-Based Polymer Conjugates with PH-Controlled Activation of Doxorubicin for Cell-Specific or Passive Tumour Targeting. Synthesis by RAFT Polymerisation and Physicochemical Characterisation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, *41* (3–4), 473–482.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.08.003>.
- (41) Šubr, V.; Ulbrich, K. Synthesis and Properties of New N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymers Containing Thiazolidine-2-Thione Reactive Groups. *Reactive and Functional Polymers* **2006**, *66* (12), 1525–1538.
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2006.05.002>.
- (42) Chytil, P.; Etrych, T.; Koňák, č.; Šírová, M.; Mrkvan, T.; Bouček, J.; Říhová, B.; Ulbrich, K. New HPMA Copolymer-Based Drug Carriers with Covalently Bound

- Hydrophobic Substituents for Solid Tumour Targeting. *Journal of Controlled Release* **2008**, *127* (2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.01.007>.
- (43) Perrier, S.; Takolpuckdee, P.; Mars, C. A. Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization: End Group Modification for Functionalized Polymers and Chain Transfer Agent Recovery. *Macromolecules* **2005**, *38* (6), 2033–2036. <https://doi.org/10.1021/ma047611m>.
- (44) Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J.-J.; Homo, J.-C.; Lepault, J.; McDowell, A. W.; Schultz, P. Cryo-Electron Microscopy of Vitrified Specimens. *Quart. Rev. Biophys.* **1988**, *21* (2), 129–228. <https://doi.org/10.1017/S0033583500004297>.
- (45) Talmon, Y. Transmission Electron Microscopy of Complex Fluids: The State of the Art. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1996**, *100* (3), 364–372. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19961000322>.
- (46) Almgren, M.; Edwards, K.; Gustafsson, J. Cryotransmission Electron Microscopy of Thin Vitrified Samples. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1996**, *1* (2), 270–278. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(96\)80015-X](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(96)80015-X).
- (47) Wang, L.; Sigworth, F. J. Cryo-EM and Single Particles. *Physiology* **2006**, *21* (1), 13–18. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2005>.
- (48) Cheng, Y. Single-Particle Cryo-EM at Crystallographic Resolution. *Cell* **2015**, *161* (3), 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.049>.
- (49) Elmlund, D.; Elmlund, H. Cryogenic Electron Microscopy and Single-Particle Analysis. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84* (1), 499–517. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034226>.
- (50) Sakho, E. H. M.; Allahyari, E.; Oluwafemi, O. S.; Thomas, S.; Kalarikkal, N. Dynamic Light Scattering (DLS). In *Thermal and Rheological Measurement Techniques for*

- Nanomaterials Characterization*; Elsevier, 2017; pp 37–49.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46139-9.00002-5>.
- (51) Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*; 1985.
- (52) Schärfl, W. *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007.
- (53) *Electron Paramagnetic Resonance*; Brustolon, M., Giamello, E., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470432235>.
- (54) Valić, S.; Andreis, M.; Klepac, D. ESR Spectroscopy of Multiphase Polymer Systems. In *Handbook of Multiphase Polymer Systems*; Boudenne, A., Ibos, L., Candau, Y., Thomas, S., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2011; pp 551–584. <https://doi.org/10.1002/9781119972020.ch14>.
- (55) *Advanced ESR Methods in Polymer Research*; Schlick, S., Ed.; Wiley-Interscience: Hoboken, N.J, 2006.
- (56) Veksli, Z. ESR Spectroscopy for the Study of Polymer Heterogeneity. *Progress in Polymer Science* **2000**, 25 (7), 949–986. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00025-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00025-3).
- (57) Li, Y.; Budamagunta, M. S.; Luo, J.; Xiao, W.; Voss, J. C.; Lam, K. S. Probing of the Assembly Structure and Dynamics within Nanoparticles during Interaction with Blood Proteins. *ACS Nano* **2012**, 6 (11), 9485–9495. <https://doi.org/10.1021/nn302317j>.
- (58) Zhou, Z.; Li, L.; Yang, Y.; Xu, X.; Huang, Y. Tumor Targeting by PH-Sensitive, Biodegradable, Cross-Linked N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide Copolymer Micelles. *Biomaterials* **2014**, 35 (24), 6622–6635. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.059>.

ŽIVOTOPIS

Martina Vragović rođena je 08.11.1996. u Rijeci, gdje i dalje živi. Od 2003. do 2011. pohađala je Osnovnu školu Vladimira Gortana u Rijeci. Nakon osnovne škole, upisala je prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije Andrije Mohorovičića u Rijeci. Nakon položene državne mature, 2015. godine upisuje Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci, a 2018. godine Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva.

Tijekom studija bila je demonstrator na općoj i fizikalnoj kemiji te medicinskoj kemiji i biokemiji, svim smjerovima medicinskog fakulteta. 2019. godine, s tematikom završnog rada dobiva nagradu za najbolju prezentaciju pod naslovom „Nanočestice - nove platforme za ispostavu lijekova“ na 2. Studentskom kongresu okolišnog zdravlja. Bila je član istraživačkog tima na projektu „Sinteza i karakterizacija pametnih polimernih nanočestica s nitroksidnim radikalima“ voditelja doc. dr. sc. Damira Klepca.

Volontirala je u Specijalističkoj postrojbi za traganje i spašavanje iz ruševina Primorsko-goranske županije, gdje je sudjelovala u aktivnostima protiv epidemije COVID-19 čime je potpomogla rad postrojbe civilne zaštite.