

Милица МАТИЈЕВИЋ^{а,б}, Јадранка МИЛЕТИЋ^{а,б}, Марија РАДОИЧИЋ^а, Анамарија НИКОЛЕТИЋ^в, Ана ПЕТРОВИЋ^г, Ања СТАНИЋ^в, Братислав ДАЧЕВИЋ^д, Маја СТОШИЋ^г, Марија НЕДЕЉКОВИЋ^б, Мина МИЛУТИНОВИЋ^е, Саима КОРАЋ^б, Соња БОЖОВИЋ^ж, Тодор ЦВЕТАНОВИЋ^з

^аИнститут за нуклеарне науке Винча, Универзитет у Београду

^бДруштво истраживача Винча

^вМатематичка гимназија, Београд

^гГимназија у Чачку

^дГимназија Врњачка Бања

^еГимназија Нови Пазар

^жГимназија Светозар Марковић, Јагодина

^зШеста београдска гимназија

^зПета београдска гимназија

НАНОКОМПОЗИТНИ ФОТОДИНАМИЧКИ СИСТЕМ ЗА КОНТРОЛИСАНУ ДОСТАВУ МЕДИКАМЕНАТА БАЗИРАНИХ НА КОМПЛЕКСИМА ПРЕЛАЗНИХ МЕТАЛА

Овај рад је део програма „Винчина научионица“ који се састоји од мултидисциплинарних радионица за ученике средњих школа, кроз које се ученици путем директној укључивања у текуће пројекте упознају са темама истраживања и пролазе кроз све фазе научно-истраживачког рада. Програм је намењен и талентованим ученицима, како би се упознали са научним радом у реалним условима, али и ученицима који се још увек нису одлучили за правце својих студија. „Винчина научионица“ се реализује од 2012. године у Институту за нуклеарне науке „Винча“ и обухвата радионице, осмишљене као мини-пројекте из хемије, физике, биологије/диомедицине, науке о материјалима, заштите од зрачења, заштите животне средине, термостехнике и енергетике. Приложени рад је део истраживачке теме из области фотодинамичке терапије, којим руководи др Маријана Пејковић (хемија/биохемија), др Милушин Стејић (фотоника) и др Зоран Шайоњић (нанонауке).

УВОД

Један од главних циљева истраживања у области модерне бионеорганске и био-органометалне хемије је развој нових лекова на бази комплекса прелазних метала с другачијом фармаколошком активношћу у односу на платинске хемотерапеутике који су у клиничкој употреби. Наиме, иако ефикасни, лекови у којима је платина централни метални јон (неки од платинских анти-туморских лекова су дати на Слици 1) су показали доста штетних ефеката у организму, као што су ототоксичност, нефротоксичност, док ћелије канцера брзо постају резистентне на лекове. [1]

Нови приступи, којима се жели повећати ефикасност у терапији тумора и умањити штетни ефекти на здраве ћелије, су нови лекови са другим централним јоном, као што су злато, [2] рутенијум, [3] бакар, [4] паладијум, [5] или цинк, [6] и, упоредо с тиме, нови системи за циљану и контролисану доставу лекова. У овом другом приступу, могу се применити разни стимуланси за ослобађање лека на месту дејства, као што су унутрашњи (особине саме туморске ћелије) или спољашњи, на пример ултразвук, светлост или

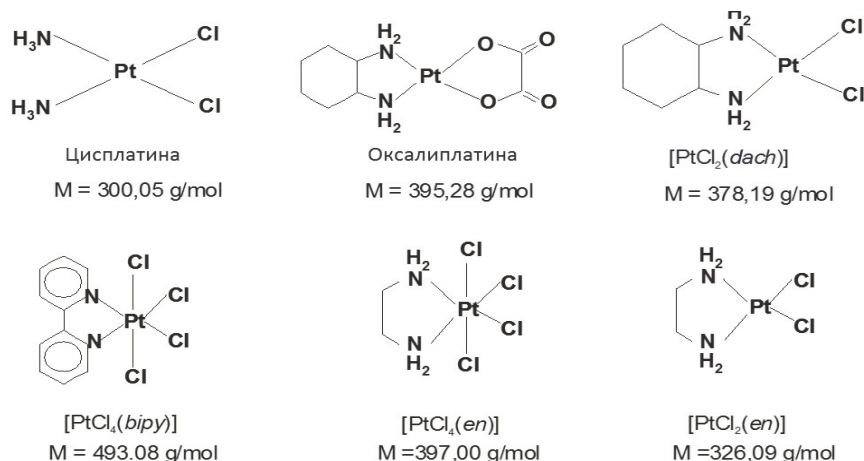
температура, чиме се умањују штетни ефекти које лекови могу имати на здрава ткива.

У овом раду ће бити дат кратак преглед досадашњих приступа терапији тумора лековима и системима за доставу лекова заснованим на комплексима прелазних метала, након чега ће бити представљени прелиминарни резултати добијени у оквиру програма „Винчина научионица“, мини-пројекта „Фотодинамичка терапија“.

Комплекси прелазних метала као анти-туморски лекови

Кључна хемијска особина метала која омогућава њихову клиничку употребу је да могу постојати у више оксидационих стања. У здравим ћелијама и у крви постоји велики број оксидо-редукујућих агенаса, а у ћелијама тумора концентрација молекулског кисеоника је нижа у односу на здраво ткиво, те оне представљају редукуюћу средину у односу на околину. Ова особина је искоришћена за активацију хемотерапеутика на месту дејства, односно у туморском ткиву. Наиме, лекови базирани на комплексима прелазних метала се дају пацијенту у неактивном стању, док се лек активира редукцијом након уласка у туморску ћелију. Друга важна карактеристика металних јона јесу реакције лигандне измене: у зависности од средине у којој се налазе, комплекси прелазних метала могу изменити електрон донирајуће лиганде, а тако и своју структуру, чиме им је омогућена интеракција са циљаним молекулима.

Лиганди могу бити атоми (Н, О, или Сl), фрагменти молекула (CR₃, NR₂, или SH), или молекули који су стабилни самостално или везани за метал (NR₃, PR₃, R₂C=CR₂, бензен, пиридин и бипиридин, амини, етиленамини, и други). Веза између метала и лиганда је координациона, чиме је и омогућена реакција „лигандне измене“ и отпуштање лиганда без значајних измена структуре. Главна улога лиганда је да регулише фармако-кинетичке параметре лека који садржи метал, омогућујући специјализовање комплекса за одређену употребу. Пример за то је задржавање комплекса у туморском ткиву помоћу лиганда велике мо-



Слика 1. Структурне и емпиријске формуле комплекса платине са молекулским масама, прво су приказани комерцијално доступни комплекси, цисплатина и оксалиплатина, затим и комплекси с познатим процедурама за синтезу с лигандима, као што су *dach* (1,2-диаминоциклохексан), *bipy* (2,2'-бипиридин), *en* (етилен-диамин)

лекулске масе, повећање уласка комплекса у туморско ткиво као последица наелектрисања лиганда, или побољшање пермеабилности комплекса, уз интензивнији ефекат његовог задржавања у туморском ткиву. [7]

Касних седамдесетих година прошлог века је званично одобрена употреба неорганског комплекса цис-диамино-дихлороплатине(II), тј. цисплатине, чија је структура дата на Слици 1. [1] И данас, комплекси метала су најчешће употребљавани медикаменти за терапију различитих типова канцера. Међутим, услед неселективног деловања у односу на тип ћелије, цисплатина катализује реакције слободних радикала и у здравим ћелијама, што има и мноштво негативних ефеката. [8] Поред ових нежељених ефеката велики проблем у примени овог цитостатика је његова слаба растворљивост, као и брзи развој резистенције туморских ћелија на терапију.

Иако је доказана антитуморска активност у *in vitro* и *in vivo* условима и координационих комплекса злата (III), рутенијума (II) и рутенијума (III), осмијума (II), титана (IV), калаја (IV), галијума (III), бакра (II), цинка (II) и бизмута (III), тренутно се од неорганских комплекса у хемиотерапији примењују искључиво поменути платински комплекси, цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, који чине 50-70% од укупне терапије која је примењена код пацијента оболелих од канцера. [9]

Посебну пажњу привлачи рутенијум као централни метални јон, [10] чији су комплекси NAMI-A, [11] и KР1019, [12] ушли у прву фазу клиничког испитивања. Рутенијум је посебно погодан пошто се може наћи у три оксидациона стања, од чега зависи и реактивност одговарајућег комплекса. Ово се огледа у томе што је, на пример, комплекс NAMI-1 активнији према метастазама, док KР1019 показује већу активност према примарним туморима. [8]

Носачи за лекове базиране на комплексима њрелазних метала

Један од начина да се превазиђу уочени проблеми у терапији лековима базираним на комплексима прелазних метала, јесте формирање носача за циљану и контролисану доставу медикамената. Носачи су дизајнирани тако да повећају стабилност лека у току транспорта кроз циркулацију, очувају га у неактивној форми док не доспе у циљано ткиво и акумулацијом повећају концентрацију лека у туморском ткиву. [13]

Носачи морају да испуњавају следеће карактеристике: да су мале величине, биолошки разградиви, или да се лако елиминишу из организма. Затим, неопходно је да буду доброг капацитета за везивање лека, способни за одржавање високе концентрације лека у циркулацији, да нису имуногени и да њихова примена доводи до акумулирања лека у туморском ткиву и у самим ћелијама. [14] Осим овога, потребно је да носач може да задржи лек у неактивном облику до доласка у туморско ткиво, као и да се услови ослобађања могу контролисати. Укратко, захтеви које носач мора да испуњава су "задржи, избегни, циљај и ослободи", (енглески - Retain, Evade, Target, Release). [15]

Развијени су различити приступи у креирању и примени носача. Један од првих испробаних система за доставу је инкапсулација лекова растворљивих у води у липозоме, што се међутим показало неприменљиво за слабо хидрофилне лекове, пошто је могућа дестабилизација мембране носача (изграђене од липидног слоја или двослоја) услед реаговања хидрофобног лека са хидрофобним делом мембране. [14] Овај проблем је превазиђен употребом носача од других материјала, као што су разни полимери и метали, односно оксиди метала.

Наночестични носачи се међусобно разликују по структури и саставу, те могу бити изграђени од полимера (полимерне наночестице, мицеле или дендри-

мери), масти (липозоми), од органометалних једињења (нанотубе) (преглед је дат у Табели 1), и различитих металних оксида. Осим структуре и састава, наносачи се међусобно разликују према начину активације, степену отпуштања у односу на стимуланс из околине, потенцијалу за циљану доставу, као и механизму деградације у ткиву и елиминације из организма.

Оптимизацијом величине наночестица, могуће је утицати на време које лек проведе у циркулацији. Како се у крви задржавају наночестице молекулске масе веће од $50.000 \text{ g mol}^{-1}$, као последица гломеруларне филтрације у бубрезима. [16] Наночестице примењене код система за доставу лека су субмикронске честице величине од 3 – 200 nm, различитог састава и различитих структурних карактеристика. Додатно, Р-гликопротеин, који се сматра директно одговорним за развој резистенције туморских ћелија, не препознаје наночестице, те оне могу да се акумулирају у туморском ткиву, што директно утиче на повећање унутарћелијске концентрације лека. [17] Полимерни материјали у својству носача нису токсични, не изазивају имуни одговор од стране пацијента, веома су растворљиви у води и одобрени су од стране FDA (*Food and Drug Administration Agency*, Агенција за храну и лекове). [18] Још једна значајна карактеристика је да 80% укупне тежине система носача/лек чини тежина самог лека, што значајно доприноси повећању концентрације лека на месту дејства. Додатни слој око наночестице, као што су полимерни омотачи, најчешће од полиетиленгликола (PEG), спречава интеракцију комплекса са тиолним групама биомолекула и омогућава дужу стабилност комплекса у циркулацији, као и већу селективност према тумору. [19]

Липозомалне формулације антрациклена доксилорубицина (Doxil, Муосет) и даунорубицина (DaunoXome) су у клиничкој употреби за лечење метастаза канцера дојке и Капошијевог саркома. Следећу генерацију липозомалних носача могли би да представљају имунолипозоми, који се селективно достављају одређеном туморском ткиву, на основу принципа антители-антиген, који је у ствари маркер/протеин карактеристичан за туморске ћелије. [17]

Посебну категорију носача лекова представљају природни полимери, као што су хитозан и алгинат, који су међусобно показали веома различите карактеристике за системе носача лека. [20] Од посебног интереса су дендримерне структуре у које могу да се укључе групе које луминесцирају након апсорпције видљиве светлости. Луминесценцијом се покрећу мултиелектронски оксидо-редукциони процеси чиме се ослобађа и/или активира лек у туморским ћелијама, али и формирају реактивне кисеоничне врсте које такође доприносе убијању туморских ћелија.

Поред наведених примера, и карбонске наноцеве се могу користити као носачи за антитуморске лекове базиране на комплексима прелазних метала. Експерименти су показали значајно повећану цитотоксичност платинског комплекса уколико је везан за

карбонске наноцеве. Наиме, модификоване карбонске нанотубе улазе у туморске ћелије ендоцитозом, при чему услед ниже киселости унутар ћелије, долази до редукције комплекса и његовог ослобађања у облику Pt(II) комплекса, а који затим, након реакције са нуклеинским киселинама, испољава своје цитотоксично дејство. [21]

Наночестице злата имају велики потенцијал као носачи за антитуморске лекове пошто су у питању инертне и нетоксичне честице које се лако синтетишу и дериватизују, а испољавају изузетну пермеабилност и потенцијал за акумулацију. Ове честице такође улазе у ћелију ендоцитозом. Један од примера модификације наночестица злата је додаток ланца PEG-а, који се помоћу тиолних група цикличног дисулфида везује за злато, а помоћу карбоксилних група за слободна места на Pt(IV) комплексу – оксалиплатини. Овакав систем је показао бољу цитотоксичност у односу на оксалиплатину самостално у свим тестираним туморским линијама, и додатно необичну способност да улази у једру ћелија рака плућа. [22]

Активација и контролисано отпуштање лекова

Један од начина да се контролише концентрација и место деловања лека, као што је већ истакнуто, јесте његова администрација у неактивном облику, односно у форми пролека. Пролек може бити дат сам или заједно с носачем, а активира се на месту дејства.

До сада, испитани су различити начини активације и отпуштања лекова. На пример, формиране су полимерне мицеле осетљиве на хипертермичке услове ($42 \text{ }^\circ\text{C}$), и системи осетљиви на промену киселости. [23] Комплекси рутенијума се такође уносе у организам у оксидованом стању, а редукују се када доспеју у туморске ћелије у којима је снижена концентрација кисеоника. Тек тако редуковани рутенијум испољава своју биолошку активност. [10] Озрачивање је још један начин активације када су у питању системи носач/лек који су осетљиви на светлост (тзв. фото-осетљиви системи, photosensitizers), о чему ће бити речи у наредном поглављу (1.4).

Имајући у виду да постоји значајна разлика у киселости нормалних (pH 7,4) и туморских ћелија (pH <5,5), активација лека овим путем је спонтана. Међутим, истраживања лекова инкапсулираних у мезопорозни SiO_2 су показала да се чак 20% лека отпушта са носача на pH 7,4. Један од начина да се овај проблем превазиђе је додаток наночестица ZnO у структуру мезопорозног силицијум диоксида, при чему ZnO има улогу да блокира отпуштање лека, док се омотач не раствори у киселој средини у близини тумора. [24]

Последњих година, са интензивним развојем нанотехнологије, доста пажње је посвећено наночестицама металних оксида, попут оксида гвожђа због магнетних особина (хематит, магнетит, магнезит). [25] ZnO, [26] TiO_2 и мезопорозног SiO_2 . [27] Неки од разлога великог интересовања научника за наночестице од металних оксида као носаче за антитуморске лекове

Систем	Структура	Карактеристике	Примери
Полимерне наночестице	Лек је везан за бочни ланац линеарног полимера	а) Растворљивост у води, нетоксичност, биодеградабилност б) Модификација површине в) Селективна акумулација и задржавање у туморској ћелији г) Циљано везивање за рецепторе туморске ћелије заједно са лигандом	Албумин-Таксол PGA-Таксол PGA-Камптотецин HPMA-DOX-галактозамин
Полимерне мицеле	Кополимери с амфиличним карактером формирају мицелу са хидрофобним језгром и хидрофилним омотачем	а) Погодни за липофилне лекове б) Биокompatibilни, могу сами да промене своју структуру, биодеградабилни в) Лако функционално модификовање г) Потенцијал за циљану доставу	PEG-плуроник-DOX PEG-PAA-DOX (NK911) PEG-PLA-Таксол
Дендримери	Од централног атома се радијално уздижу разгранати полимерни ланци који се даље бочно гранају правећи облик сфере	а) Могуће подешавање биодистрибуције и фармакокинетики б) Велика структурна и хемијска хомогеност в) Лако везивање функционалних група, велика густина лиганда г) Контролисање деградације д) Мултифункционалност	PAMAM-MTX PAMAM-платинат
Липозоми	Лоптасте везикуле од амфилних фосфолипида и холестерола, који се самоорганизују у два слоја и затварају средишњи простор	а) Амфилични, биокompatibilни б) Лако модификовање в) Потенцијал за циљану доставу	Дауноксом Доксил Миоцет
Карбонске нанотубе	Карбонски цилиндри изграђени од прстенова бензена	а) Растворљиви у води и биокompatibilни кроз хемијску модификацију б) Мултифункционалност	CNT-MTX CNT-амфотерицин Б
Скраћенице: PGA, поли-(2-глутамат); HPMA, N-(2-хидроксопропил)-метакриламид кополимер; PEG, полиетилен гликол; PAA, поли-(L-аспартат); PLA, поли-(L-лактид); PAMAMA, поли(амидамин); DOX, доксорубицин; MTX, метотрексат; CNT, карбонске нанотубе.			

каменте су могућност апсорпције светлости одређене таласне дужине, могућност модификације површине и интеракција са разним групама хемијских једињења. Осим овога, метални оксиди и метали се могу акумулирати у туморским ћелијама путем рецептора за метале, који су заступљени у већој количини на површини туморских ћелија у односу на здраве.

Фотосензитиван систем за доставу лекова базиран на наночестицама TiO_2 и комплексу йрелазних метала

Титанијум (IV) оксид има широку употребу и у медицини, али и примену у технологији, генерално, због својих особина као што су стабилност, инертност, велика специфична површина и могућност површинских модификација. У литератури је описано неколико система у којима су ове честице носачи за лекове. На пример, познат је систем с даунорубицином (DNR) везаним за TiO_2 (DNR – TiO_2). Лек је за површину на-

нечестица везан електростатичким путем. Наиме, на рН 7,4 наночестице TiO_2 су негативно наелектрисане, што утиче на формирање електростатичких интеракција између наночестица и молекула DNR. На основу тога, претпоставља се да неколико молекула DNR може бити везано за једну наночестицу TiO_2 . За овај систем је карактеристично да туморске ћелије умиру апоптозом, што је последица значајног повећања концентрације лека у ћелијама у односу на систем без носача, што даље указује да систем са носачем има већу пермеабилност. [28]

Наночестице TiO_2 улазе у ћелију фагоцитозом, али се могу наћи и акумулирати на ћелијској мембрани. [29] Особина, која их чини посебно погодном јесте могућност апсорпције светлости и то у ултраљубичастом делу спектра, што доводи до њихове активације. Наиме, светлом активирани наночестице TiO_2 испољавају снажнији цитотоксични ефекат на малигне ћелије, док су без озрачивања мање токсичне. [30] Осветљене наночестице стимулишу продукцију реак-

тивних кисеоничних врста, односно индукују оксидативни стрес, који доводи до некрозе малигних ћелија. Потребно је истаћи да се раније сматрало да је механизам убијања туморских ћелија индуковањем оксидативног стреса апоптоза, док је у скоријим радовима показано да је механизам индуковања ћелијске смрти реактивним кисеоничним врстама, некроза. [30] Ова врста терапије се назива фотодинамичка терапија (Photodynamic therapy – PDT енгл., ФДТ срп.) и у питању је врста третмана који се већ успешно примењује код одређеног броја болести и поремећаја (макуларна дегенерација, псоријаза, неке врсте канцера). [31] ФДТ је минимално инвазивна врста третмана, у којој се светлост одређене таласне дужине примењује локално и активира фотоосетљиву супстанцу која се налази у туморском ткиву. Та супстанца може, или апсорбовану енергију да пренесе на лек, или да активира сам лек да производи реактивне кисеоничне врсте/слободне радикале, [32] за које је познато да су, у биолошкој средини, токсични и да могу да реагују са ћелијским садржајем реметећи функције ћелије и доводећи до ћелијске смрти.

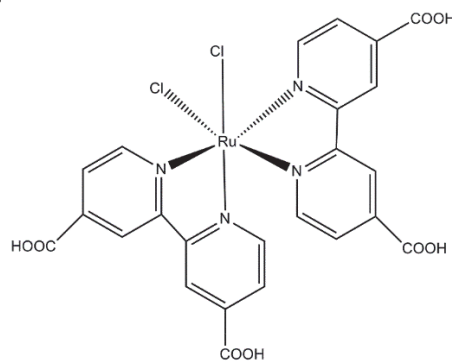
Озрачивање светлосту представља атрактиван начин стимулације, првенствено због тога што је светлост недеструктиван агенс, а сам процес може бити врло прецизно контролисан помоћу подешавања интензитета светлости и времена излагања, са једне стране, и таласне дужине светлости као и пречника снопа који делује на оболело ткиво, са друге стране.

У нашој групи је формиран наноконтролисани систем (НКС) од наночестица TiO_2 и рутенијумовог комплекса (*cis*-дихлоробис (2,2'-бипиридил-4,4'-дикарбоксилна киселина) рутенијум(II) – скраћено $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$, (Слика 2) везаног за површину честица, [33] који је такође фотоосетљив. Претходним експериментима смо утврдили да је брзину отпуштања комплекса с површине наночестица могуће контролисати применом светлости различитих таласних дужина; прецизније, дејством ултраљубичасте светлости, брзина отпуштања се повећавала, док се смањивала дејством црвене и зелене светлости. Фотоосетљивост система је и била очекивана, пошто његове компоненте апсорбују у ултраљубичастој области (наночестице TiO_2), док рутенијумов комплекс апсорбује и у видљивом делу спектра.

Биолошка активност самог комплекса је показана испитивањем његове интеракције са биолошки значајним молекулима и дејства на ћелије. [33] Такође, НКС је показао цитотоксични ефекат на ћелије меланома А375, [34] који је значајно појачан дејством ултраљубичасте светлости. С друге стране, дејство видљиве светлости је имало другачији ефекат: цитотоксичност система је смањена.

У оквиру мини-пројекта "Фотодинамичка терапија", као дела циклуса "Винчина научионица" посматрали смо НКС формиран од колоидних наночестица TiO_2 и претходно синтетисаног рутенијумовог комплекса, који смо, са циљем да повећамо његову пермеабилност у ћелије и испитамо утицај светлости на бр-

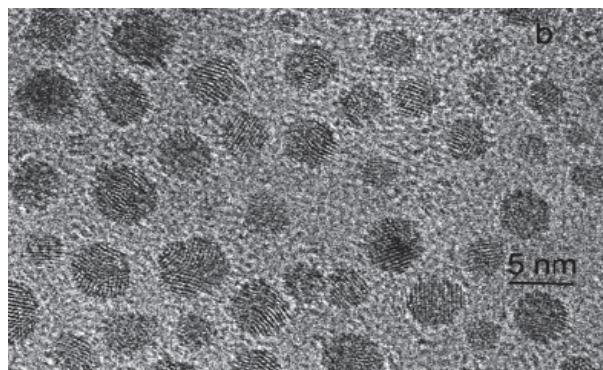
зину отпуштања комплекса, инкапсулирали у липозоме, и посматрали упоредо са системом без присуства липида.



Слика 2. Структура комплекса $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Колоидне честице TiO_2 (Слика 3) пречника око 5 nm, су синтетисане у Лабораторији за радијациону хемију и физику Института Винча према стандардизованој процедури. [35] Добијен је бистар раствор колоида, стабилизован на рН 7, концентрације 20 mM.



Слика 3. ТЕМ снимак високе резолуције наночестице TiO_2 [36]

Комплекс прелазног метала, $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ (Слика 2), је синтетисан и окарактерисан претходно, [33] према процедури из литературе. [37] За изоловање фосфолипида употребљено је жуманце кокошијег јајета, за које је познато да садржи висок проценат фосфатидил-холина, који је и основни састојак мембране ћелија. Добијени раствор са фосфолипидима је анализиран танкослојном хроматографијом (Thin Layer Chromatography, енгл. TLC, срп. ТЛЦ), чиме је потврђено присуство одређених фосфолипида. Од добијеног раствора, примењујући ултразвук, направљене су мале униламеларне везикуле (МУВ), према процедури описаној даље у тексту.

Наноконтролисани систем

У реакционом суду помешано је 100 μl раствора комплекса рутенијума, $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$, у етанолу (0,5 mM) с 900 μl воденог раствора TiO_2 (20 mM, рН 7,0), процењујући да је удео атома Ti на које може да се веже комплекс $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ на површини наночестица 30%. [35] Реакциона смеша је инкубирана то-

ком ноћи на собној температури, уз мешање и одсуство светлости, како би се формирао нанокмпозитни систем, НКС. Након центрифугирања, добијени талог је растворен у 10 mM фосфатном пуферу.

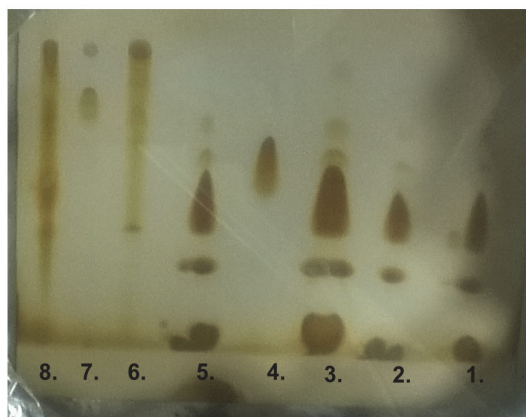
Иzolовање фосфолипида и формирање малих униламеларних везикула (МУВ)

Коришћењем смеше поларних и неполарних растварача могућа је потпуна екстракција липида из животињских и биљних узорака, те смо користили мешу хлороформа и метанола (2:1, запремински односи), [34] због способности хлороформа да добро раствара липиде, а метанола да добро продире у ткиво.

МУВ су припремљене према поступку коју су користили Алонсо и сарадници, [38] уз коришћење ултразвука. Према литератури, добијени МУВ требало би да имају просечан пречник од 30 nm.

Танкослојна хроматографија – идентификација изолованих фосфолипида

Екстраховани фосфолипиди из жуманцета јајета су окарактерисани уз помоћ танкослојне хроматографије. ТЛЦ је рађена на следећи начин: непосредно пре добијања сувог остатка при упаравању екстрахованог жуманцета, узет је део и нанет на плочицу за хроматографију (превучену силика гелом). Фосфолипиди су визуализовани уз помоћ пара јода. На основу стандарда (Слика 4) утврђено је присуство фосфатидилхолина, као и одсуство дипалмитоил-фосфатидилхолина. Могуће је присуство сфингомијелина и фосфатидилнозитола у траговима. Додатном претрагом литературе се испоставило да је поред ових фосфолипида заступљен и фосфатидилетаноламин.



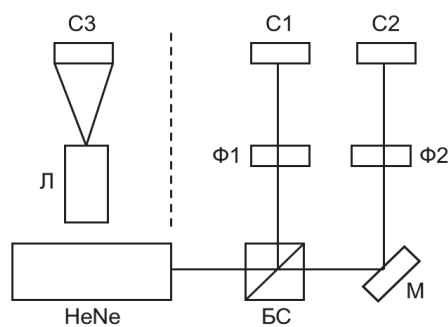
Слика 4. Фотографија плочице са силика гелом за танкослојну хроматографију употребљене за идентификацију изолованих фосфолипида, с десна на лево: 1. Фосфатидилхолин, 2. Лизофосфатидилхолин, 3. Дипалмитоилфосфатидилхолин, 4. Разблажен суви остатак жуманцета, 5. Сфингомијелин, 6. Разблажен суви остатак жуманцета, 7. Двоструко разблажен суви остатак жуманцета, 8. Проструко разблажен суви остатак жуманцета

Инкапсулација НКС у МУВ

Добијене МУВ, у концентрацији од 50 µg/ml, је помешан с НКС у односу 1:1. На овај начин добијени систем који се састоји од НКС-а и липозома је коришћен у даљим експериментима под истим условима као и систем који није био инкапсулиран у МУВ.

Праћење ошћивања комплекса са површине НКС под дејством црвене и ултраљубичасте светлости

У касете за дијализу капацитета 0,1 – 0,5 ml (Thermo Scientific Dialysis cassette, 7.000 MWCO), помоћу игле је унето по 0,5 ml раствора НКС-а, или 0,5 ml у случају НКС-а инкапсулираног у МУВ, а које су затим потопљене у 60 ml фосфатног пуфера. Направљене су три идентичне пробе за оба система (са и без липозома). На собној температури, уз стално мешање магнетом, по једна проба за оба система је држана у мраку и служила је као контролна проба, друге две пробе су биле изложене континуалним црвеним зрацима He-Ne ласера (Thorlabs, 2 mW, 632.8 nm), а преостале две пробе су озрачиване ултраљубичастим зрацима (Philips, 15 W, 254 nm), током 4h. Црвени ласер је био усмерен бочно у односу на лабораторијску чашу у којој се у раствору фосфатног пуфера налазила касета за дијализу, док је ултраљубичаста лампа постављена изнад чаше са пробом, пошто стакло представља препреку за ултраљубичасте зраке. Дизајн експеримента је приказан на слици 5. Из проба је одвајан по 1 ml аликуота, у истим временским интервалима, на 30, 60, 120 и 240 минута, у обележену вијалу, а сваки пут одвојена количина у пробама је била замењена са еквивалентном количином фосфатног пуфера. Узорци, Табела 2, су центрифугирани па затим анализирани на двозрачном спектрофотометру у видљивом и ултраљубичастом делу спектра, у опсегу од 200 до 800 nm, (Perkin Elmer Lambda 35).



Слика 5. Скица поставке експеримента. Објашњење скраћеница: C1, C2, C3 – ознаке проба; HeNe - хелијум неонски ласер; BC - делилац снопа (BS010, 50:50 Non-Polarizing Beamsplitter Cube, Thorlabs); Ф1, Ф2 - филтери оптичке густине (continuously variable neutral density filters ND10C-4, Thorlabs); M - високорефлективно диелектрично огледало (broadband dielectric mirror BB1-E02, Thorlabs); Л - ултраљубичаста лампа (UV-C, 254 nm, 15 W, Phillips)

Табела 2. Ознаке узорака добијених издвајањем аликвота у тесту отпуштања комплекса

Тип система	НКС			Липозоми + НКС		
	Мрак	UV	Црвена	Мрак	UV	Црвена
0	МоС	ВоС	ЦоС	МоЛ	ВоЛ	ЦоЛ
30	М30С	В30С	Ц30С	М30Л	В30Л	Ц30Л
60	М60С	В60С	Ц60С	М60Л	В60Л	Ц60Л
120	М120С	В120С	Ц120С	М120Л	В120Л	Ц120Л
240	М240С	В240С	Ц240С	М240Л	В240Л	Ц240Л

Дефиниција ознака у називима узорака: М-контролни узорци из мрака, В-узорци озрачивани ултраљубичастом светлошћу, Ц-узорци озрачивани црвеном светлошћу, 0,30,60,120,240-ознаке у вези са временским интервалом, Л-узорци инкапсулирани у липозоме

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Како би се повећао улазак НКС у ћелије, читав систем је инкапсулиран у МУВ, чији састав одговара саставу ћелијске мембране. Друга предност инкапсулације НКС у липозоме је присуство фосфатидилхолина, којим се повећава и стабилност система у циркулацији/крвној плазми и смањује се проценат “цурења” лека. [39]

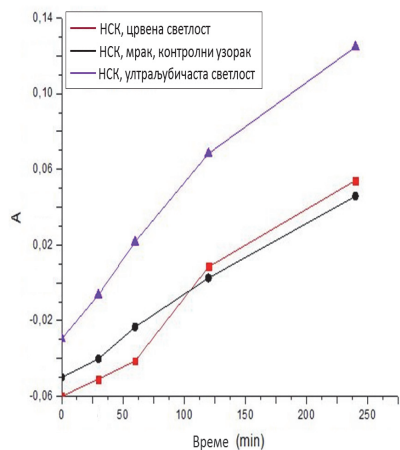
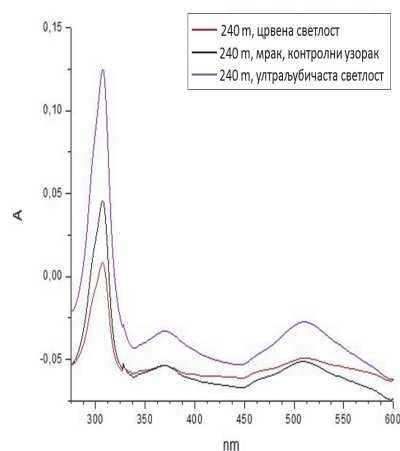
У првом делу експеримента, праћена је брзина отпуштања комплекса с површине наночестица под дејством светлости, а тај експеримент је поновљен и с НКС инкапсулираним у липозоме.

Утицај светлости на отпуштање комплекса с површине честица

НКС је осветљаван црвеном и ултраљубичастом светлошћу, док је количина отпуштеног комплекса $[Ru(II)(dcby)_2Cl_2]$ из система праћена снимањем UV-Vis спектра.

Са добијених спектра од којих је један део приказан на Слици 6 (а), очитане су апсорбанце на 310 nm, како је на тој таласној дужини апсорпција комплекса највиша. Добијене апсорбанце су приказане у зависности од временског интервала у којем су узимани аликвоти (Слика 6 (б)). Криве зависности концентрације отпуштеног комплекса су показале раст с временом. У узорцима који су осветљавани ултраљубичастом лампом, забележен је значајно већи раст концентрације у односу на контролну пробу из мрака. С друге стране, тај пораст је знатно мањи у случају деловања црвене светлости.

Посматрањем појединачних спектра може се уочити сличан тренд, за шта су пример спектри након 240 min озрачивања, или стајања у мраку, код којих се примећује да је апсорпција значајно већа када је узорак озрачен ултраљубичастом лампом, у односу на црвену светлости и одсуство светлости, Слика 6 (а). Из свега наведеног може се закључити да деловање црвене светлости делује супресивно на отпуштање НКС-а током првих 60 min, а да затим озрачивање црвеном светлости нема значајног утицаја, док озрачивање проба ултраљубичастим зрацима значајно убрзава отпуштање комплекса, од самог почетка праћења отпуштања.



Слика 6. (а), горе - Спектри добијени снимањем аликвота из теста отпуштања, сваке пробе НКС-а, након 240 min; (б), доле - Крива зависности апсорпције од времена, за сваку пробу НКС-а

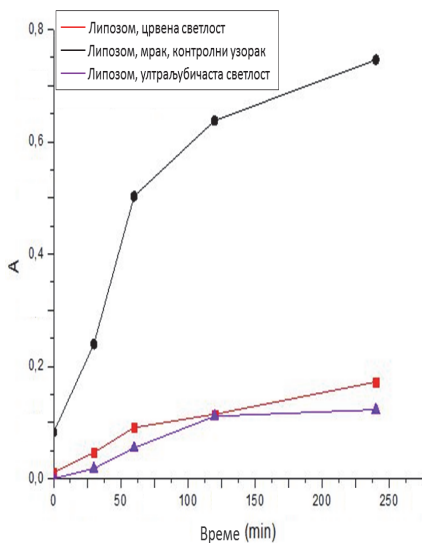
У претходним истраживањима, показали смо да се током 4h из нанокompatитног система у контролном узорку, отпусти око 50% комплекса $[Ru(II)(dcby)_2Cl_2]$, а да је потребно 28h да се отпусти 100%, те није било могуће дефинисати апсорбанцу која представља 100% отпуштеног комплекса и конструисати криву зависности процента отпуштеног комплекса са временом. [33]

Посматрајући криве отпуштања добијене у ранијим истраживањима, може се запазити да се током првих сати ослобађа велика концентрација, и да се то-

ком више сати отпуштање стабилизује. Овај феномен иницијалног брзог раста концентрације комплекса је познат као *Burst* ефекат (Eng. *Burst* – Експлозија), за који је могуће објашњење да одмах након активације НКС у фосфатном пуферу, долази до отпуштања комплекса који је био слабије везан или остао невезан за TiO_2 , што се одражава на нагли пораст концентрације ослобођеног комплекса. Криве зависности апсорбације и времена, које смо добили у експерименту, Слика 6 (б), показују исти тренд брзог отпуштања комплекса, чиме је потврђен утицај светлости на кинетичке параметре отпуштања комплекса с површине колоидних наночестица.

Испитивање комплекса са НКС инкапсулираног у липозоме

Када је реч о НКС инкапсулираног у мале униламеларне везикуле, очекивали смо да систем буде стабилизован инкапсулацијом у липозом, а брзина отпуштања комплекса спорија него када је цео систем слободан. Такође, имали смо у виду да интеракције између наночестица, активних група из комплекса и фосфолипидна могу да доведу до нешто измењених резултата, те да је у случају неслагања добијених резултата са претходном тврдњом, потребно испитати и узети у обзир и саму природу интеракција НКС са фосфолипидима у инкапсулираном систему.



Слика 7. Крива зависности апсорбације од времена, за сваку пробу НКС-а инкапсулираног у МУВ

Резултати које смо добили на основу прочитаних апсорбаци су приказани у зависности од времена, те се на Слици 7 види да је до значајног пораста отпуштања комплекса дошло код узорака који су стајали у мраку, док је примена светлости довела до смањења отпуштања комплекса. Овај резултат је значајно различит од претходно добијених резултата, са НКС који није инкапсулиран у липозоме, те је потребно спровести додатне експерименте како би се утврдио разлог. Могуће је да због присуства липозома светлост

није могла да продре до НКС и интерагује са комплексом, чиме би се могло објаснити смањење брзине отпуштања комплекса. С друге стране, интеракција фосфолипидна са комплексом у мраку је могла да доведе до повећања брзине отпуштања комплекса са НКС, односно, његове активације, на сличан начин као што је показано са неким платинским комплексима. [40]

ЗАКЉУЧАК

С циљем оптимизације фотодинамичке терапије у којој су примењене антитуморске особине комплекса $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ и фотокаталитичке особине наночестица TiO_2 , истовремено смо испитали слободан наноконтролни систем, и НКС инкапсулиран у липозоме у форми малих униламеларних везикула. Резултати које смо добили у случају слободног НКС су у корелацији с претходним истраживањима, међутим, резултати које смо добили код инкапсулираног система сугеришу значајан утицај инкапсулације на динамику отпуштања и активације система у односу на слободан систем. Пре закључка да инкапсулација испитиваног НКС у липозоме дестабилише систем, што није жељена особина код примене носача за контролисану доставу лекова, неопходно је спровести даља испитивања, како би се утврдио тачан механизам интеракције НКС с фосфолипидима и начин дејства светлости на оба система.

Abstract

NANOCOMPOSITE PHOTODYNAMIC SYSTEM FOR CONTROLLED DELIVERY OF MEDICAMENTS BASED ON TRANSITION METAL COMPLEXES

Milica MATIJEVIĆ, Jadranka MILETIĆ, Marija RADOIČIĆ, Anamarija NIKOLETIĆ, Ana PETROVIĆ, Anja STANIĆ, Bratislav DAČEVIĆ, Maja STOŠIĆG, Marija NEDELJKOVIĆ, Mina MILUTINOVIĆ, Saima KORAC, Sonja BOŽOVIĆ, Todor CVETANOVIĆ

This paper gives an overview of the current approaches to therapy of tumors with medicaments and systems for delivery of medicaments based on complexes of transition metals.

In order to optimize the photodynamic therapy in which the antitumor properties of the complex $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ were applied, as a model of the system and the photocatalytic properties of TiO_2 nanoparticles, in addition to the revised section.

The results were obtained within the program "Vinčina učionica", mini -project "Photodynamic Therapy", in which we simultaneously tested the free nanocomposite system (NCS), and NCS encapsulated in liposomes in the form of small unilamellar vesicles.

The results obtained in the case of free NCS are in correlation with previous research. However, the results obtained in the encapsulated system suggest a significant impact of encapsulation on the release and activation dynamics of the system relative to the free system.

ЛИТЕРАТУРА

- Cohen, S. M.; Lippard, S. J. Cisplatin: From DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2001**, *67*, 93–130. <http://www.mendeley.com/catalog/cisplatin-dna-damage-cancer-chemotherapy-1/>

2. Snyder, R. M.; Mirabelli, C. K.; Johnson, R. K.; Sung, C.-M.; Faucette, L. F.; McCabe, F. L.; Zimmerman, J. P.; Whitman, M.; Hempel, J. C.; Crooke, S. T. Modulation of the Antitumor and Biochemical Properties of Bis(diphenylphosphine)ethane with Metals. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 5054–5060. <http://www.mendeley.com/research/modulation-antitumor-biochemical-properties-bis-diphenylphosphine-ethane-metals-modulation-antitumor/>
3. Mari, C.; Gasser, G. Lightening up Ruthenium Complexes to Fight Cancer. *Chim. Int. J. Chem.* **2015**, *69*, 176–181. <http://www.mendeley.com/research/lightening-up-ruthenium-complexes-fight-cancer/>
4. Crim, J. A.; Petering, H. G. The Antitumor Activity of Cu(II)KTS, the Copper(II) Chelate of 3-Ethoxy-2-oxobutylaldehyde Bis(thiosemicarbazone). *Cancer Res.* **1967**, *27*, 1278–1285. <http://www.mendeley.com/research/antitumor-activity-cu-ii-kts-copper-ii-chelate-3ethoxy2oxobutylaldehyde-bisthiosemicarbazone/>
5. Garoufis, A.; Hadjikakou, S. K.; Hadjiliadis, N. Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1384–1397. <http://www.mendeley.com/catalog/palladium-coordination-compounds-antiviral-antifungal-antimicrobial-antitumor-agents/>
6. Frezza, M.; Hindo, S.; Chen, D.; Davenport, A.; Schmitt, S.; Tomco, D.; Ping Dou, Q. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 1813–1825. <http://www.mendeley.com/catalog/novel-metals-metal-complexes-platforms-cancer-therapy/>
7. Iyer, A. K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 812–818. <http://www.mendeley.com/catalog/exploiting-enhanced-permeability-retention-effect-tumor-targeting/>
8. Glisic, B. D.; Zivkovic, M. D.; Rajkovic, S.; Djuran, M. Medicinal inorganic chemistry - different aspects of application of the transition metal complexes in medicine. *Hem. Pregl.* **2013**, *2*, 30–35. <http://www.mendeley.com/research/medicinal-inorganic-chemistry-different-aspects-application-transition-metal-complexes-medicine-1/>
9. Dyson, P. J.; Sava, G. Metal-based antitumor drugs in the post genomic era. *Dalt. Trans.* **2006**, 1929–1933. <http://www.mendeley.com/catalog/metalbased-antitumor-drugs-post-genomic-era/>
10. Levina, A.; Mitra, A.; Lay, P. A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics* **2009**, *1*, 458–470. <http://www.mendeley.com/catalog/recent-developments-ruthenium-anticancer-drugs-1/>
11. Bratsos, I.; Jedner, S.; Gianferrara, T.; Alessio, E. Ruthenium Anticancer Compounds: Challenges and Expectations. *Chim. Int. J. Chem.* **61**, 692–697. <http://www.mendeley.com/catalog/ruthenium-anticancer-compounds-challenges-expectations/>
12. Groessel, M.; Reisner, E.; Hartinger, C. G.; Eichinger, R.; Semenova, O.; Timerbaev, A. R.; Jakupec, M. A.; Arion, V. B.; Keppler, B. K. Structure–Activity Relationships for NAMI-A-type Complexes (HL)[trans-RuCl₄L(S-dmsoruthenate(III))] (L = Imidazole, Indazole, 1,2,4-Triazole, 4-Amino-1,2,4-triazole, and 1-Methyl-1,2,4-triazole): Aquation, Redox Properties, Protein Binding, and Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.* **50**, 2185–2193. <http://www.mendeley.com/research/structureactivity-relationships-nami-type-complexes-hltransrucl4l-s-dmsoruthenateiii-l-imidazole-indazole/>
13. Syu, W. J.; Yu, H. P.; Hsu, C. Y.; Rajan, Y. C.; Hsu, Y. H.; Chang, Y. C.; Hsieh, W. Y.; Wang, C. H.; Lai, P. S. Improved photodynamic cancer treatment by folate-conjugated polymeric micelles in a KB xenografted animal model. *Small* **2012**, *8*, 2060–2069. <http://www.mendeley.com/research/improved-photodynamic-cancer-treatment-folateconjugated-polymeric-micelles-kb-xenografted-animal-mod/>
14. Torchilin, V. P.; Lukyanov, A. N.; Gao, Z.; Papahadjopoulos-Sternberg, B.; Klibanov, A. M. Immunomicelles: Targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 6039–6044. <http://www.mendeley.com/catalog/immunomicelles-targeted-pharmaceutical-carriers-poorly-soluble-drugs/>
15. Needham, D.; Anyarambhatla, G.; Kong, G.; Dewhirst, M. W. A New Temperature-sensitive Liposome for Use with Mild Hyperthermia: Characterization and Testing in a Human Tumor Xenograft Model. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1997–2001. <http://www.mendeley.com/research/new-temperaturesensitive-liposome-mild-hyperthermia-characterization-testing-human-tumor-xenograft-m-4/>
16. Blunden, B. M.; Stenzel, M. H. Incorporating ruthenium into advanced drug delivery carriers-an innovative generation of chemotherapeutics. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2015**, *90*, 1177–1195. <http://www.mendeley.com/catalog/incorporating-ruthenium-advanced-drug-delivery-carriers-innovative-generation-chemotherapeutics/>
17. Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z. (Georgia); Shin, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1310–1316. <http://www.mendeley.com/catalog/therapeutic-nanoparticles-drug-delivery-cancer-30/>
18. Veronese, F. M.; Pasut, G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1451–1458. <http://www.mendeley.com/catalog/pegylation-successful-approach-drug-delivery-1/>
19. Nishiyama, N.; Kato, Y.; Sugiyama, Y.; Kataoka, K. Cisplatin-Loaded Polymer-Metal Complex Micelle with Time-Modulated Decaying Property as a Novel Drug Delivery System. *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1035–1041. <http://www.mendeley.com/catalog/cisplatinloaded-polymermetal-complex-micelle-timemodulated-decaying-property-novel-drug-delivery-sys/>
20. Hamidi, M.; Azadi, A.; Rafiei, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1638–1649. <http://www.mendeley.com/catalog/hydrogel-nanoparticles-drug-delivery-1/>
21. Feazell, R. P.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H.; Stephen J. Lippard Soluble Single-Walled Carbon Nanotubes as Longboat Delivery Systems for Platinum(IV) Anticancer Drug Design. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8438–8439. <http://www.mendeley.com/catalog/soluble-singlewalled-carbon-nanotubes-longboat-delivery-systems-platinumiv-anticancer-drug-design/>
22. Brown, S. D.; Nativo, P.; Smith, J.-A.; Stirling, D.; Edwards, P. R.; Venugopal, B.; Flint, D. J.; Plumb, J. A.; Graham, D.; Wheate, N. J. Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4678–4684. <http://www.mendeley.com/catalog/gold-nanoparticles-improved-anticancer-drug-delivery-active-component-oxaliplatin-9/>
23. Na, K.; Eun, S. L.; You, H. B. Self-Organized Nanogels Responding to Tumor Extracellular pH: pH-Dependent Drug Release and in Vitro Cytotoxicity against MCF-7 Cells. *Bioconjugate Chem* **2007**, *18*, 1568–1574. <http://www.mendeley.com/research/selforganized-nanogels-responding-tumor-extracellular-ph-phdependent-drug-release-vitro-cytotoxicity/>

24. Wang, Y.; Song, S.; Liu, J.; Liu, D.; Zhang, H. ZnO-functionalized upconverting nanotheranostic agent: Multi-modality imaging-guided chemotherapy with on-demand drug release triggered by pH. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54*, 536–540. <http://www.mendeley.com/research/znofunctionalized-upconverting-nanotheranostic-agent-multimodality-imagingguided-chemotherapy-ondema/>
25. Chertok, B.; Moffat, B. A.; David, A. E.; Yu, F.; Bergemann, C.; Ross, B. D.; Yang, V. C. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials* **2008**, *29*, 487–496. <http://www.mendeley.com/catalog/iron-oxide-nanoparticles-drug-delivery-vehicle-mri-monitored-magnetic-targeting-brain-tumors-14/>
26. Rasmussen, J. W.; Martinez, E.; Louka, P.; Wingett, D. G. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 1063–1077. <http://www.mendeley.com/catalog/zinc-oxide-nanoparticles-selective-destruction-tumor-cells-potential-drug-delivery-applications/>
27. Slowing, I.; Viveroescoto, J.; Wu, C.; Lin, V. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1278–1288. <http://www.mendeley.com/catalog/mesoporous-silica-nanoparticles-controlled-release-drug-delivery-gene-transfection-carriers-21/>
28. Zhang, H.; Wang, C.; Chen, B.; Wang, X. Daunorubicin-TiO₂ nanocomposites as a “smart” pH-responsive drug delivery system. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 235–242. <http://www.mendeley.com/research/daunorubicin-tio2-nanocomposites-smart-phresponsive-drug-delivery-system/>
29. Zhang, A.-P.; Sun, Y.-P. Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World J Gastroenterol World J Gastroenterol* **2004**, *10*, 3191–3193. <http://www.mendeley.com/research/photocatalytic-killing-effect-tio2-nanoparticles-ls174t-human-colon-carcinoma-cells-1/>
30. Xu, M.; Huang, N.; Xiao, Z.; Lu, Z. Photoexcited TiO₂ nanoparticles through •OH-radicals induced malignant cells to necrosis. *Supramol. Sci.* **1998**, *5*, 449–451. <http://www.mendeley.com/research/photoexcited-tio2-nanoparticles-through-oh-radicals-induced-malignant-cells-necrosis/>
31. Josefsen, L. B.; Boyle, R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met. Based. Drugs* **2008**, *2008*, 24. <http://www.mendeley.com/catalog/photodynamic-therapy-development-metalbased-photosensitisers/>
32. Teng, Í.-T.; Chang, Y.-J.; Wang, L.-S.; Lu, H.-Y.; Wu, L.-C.; Yang, C.-M.; Chiu, C.-C.; Yang, C.-H.; Hsu, S.-L.; Ho, J. A. Phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers for selective photodynamic therapy of cancer. *Biomaterials* **2013**, *34*, 7462–7470. <http://www.mendeley.com/research/phospholipidfunctionalized-mesoporous-silica-nanocarriers-forselective-photodynamic-therapy-cancer/>
33. Nešić, M.; Popović, I.; Leskovac, A.; Šaponjić, Z.; Radoičić, M.; Stepić, M.; Petković, M. Testing the photo-sensitive nanocomposite system for potential controlled metallo-drug delivery. *Opt. Quantum Electron.* **2016**, *48*, 119–126. <http://www.mendeley.com/research/testing-photosensitive-nanocomposite-system-potential-controlled-metallodrug-delivery/>
34. Nišavić, M.; Masnikosa, R.; Butorac, A.; Perica, K.; Rilak, A.; Korićanac, L.; Hozić, A.; Petković, M.; Cindrić, M. Elucidation of the binding sites of two novel Ru(II) complexes on bovine serum albumin. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *159*, 89–95. <http://www.mendeley.com/catalog/elucidation-binding-sites-two-novel-ruii-complexes-bovine-serum-albumin/>
35. Rajh, T.; Ostafin, A. E.; Micic, O. I.; Tiede, D. M.; Thurnauer, M. C. Surface Modification of Small Particle TiO₂ Colloids with Cysteine for Enhanced Photochemical Reduction: An EPR Study. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 4538–4545. <http://www.mendeley.com/research/surface-modification-small-particle-tio2-colloids-cysteine-enhanced-photochemical-reduction-epr-stud/>
36. Dimitrijevic, N. M.; Saponjic, Z. V.; Bartels, D. M.; Thurnauer, M. C.; Tiede, D. M.; Rajh, T. Revealing the nature of trapping sites in nanocrystalline titanium dioxide by selective surface modification. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7368–7375. <http://www.mendeley.com/catalog/revealing-nature-trapping-sites-nanocrystalline-titanium-dioxide-selective-surface-modification/>
37. Nazeeruddin, M. K.; Zakeeruddin, S. M.; R., H.-B.; Jirousek, M.; Liska, P.; Vlachopoulos, N.; Shklover, V.; Fischer, C.-H.; Gratzel, M. {Acid-Base} Equilibria of {(2,2'-Bipyridyl-4,4'-dicarboxylic}{acid}ruthenium(II)} Complexes and the Effect of Protonation on {Charge-Transfer} Sensitization of Nanocrystalline Titania. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 6298–6305. <http://www.mendeley.com/catalog/acidbase-equilibria-22bipyridyl44dicarboxylic-acidrutheniumii-complexes-effect-protonation-chargeetra/>
38. Alonso, A.; Sáez, R.; Villena, A.; Goñi, F. M. Increase in size of sonicated phospholipid vesicles in the presence of detergents. *J. Membr. Biol.* **1982**, *67*, 55–62. <http://www.mendeley.com/research/increase-size-sonicated-phospholipid-vesicles-presence-detergents/>
39. Gabizon, A.; And, T.; Papahadjopoulos, D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors (phospholipid vesicles/drug delivery systems/cancer therapy/glycolipids). *Med. Sci.* **1988**, *85*, 6949–6953. <http://www.mendeley.com/catalog/liposome-formulations-prolonged-circulation-time-blood-enhanced-uptake-tumors/>
40. Kamčeva, T.; Flemmig, J.; Damnjanović, B.; Arnhold, J.; Mijatović, A.; Petković, M.; Burke, B.; Zhai, Q. J.; Wang, J.; Oleksowicz, L.; Lu, S. Inhibitory effect of platinum and ruthenium bipyridyl complexes on porcine pancreatic phospholipase A₂. *Metallomics* **2011**, *3*, 1056–1063. <http://www.mendeley.com/research/inhibitory-effect-platinum-ruthenium-bipyridyl-complexes-porcine-pancreatic-phospholipase-a2/>