



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
AKADEMSKE DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

**KOMPARATIVNO *IN VITRO* ISPITIVANJE EFEKATA UGLJENIČNIH NANOCEVI U
NORMALNIM I MALIGNIM ĆELIJAMA PLUĆA**

-DOKTORSKA DISERTACIJA-

Mentori:

Dr sc. med. dr Gordana Bogdanović

Doc. dr Branislava Srđenović Čonić

Kandidat:

Nikola Jojić

Novi Sad, 2017.

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ****KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Nikola Jojić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr sc. med. dr Gordana Bogdanović, viši naučni saradnik Doc. dr Branislava Srđenović Čonić, docent
Naslov rada: NR	Komparativno <i>in vitro</i> ispitivanje efekata ugljeničnih nanocevi u normalnim i malignim ćelijama pluća
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	<u>srp.</u> / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2017.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Vojvodina, Srbija

Fizički opis rada: FO	(7 poglavlja / 114 stranica / 10 slika / 30 grafikona / 4 tabele / 116 referenci)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Farmakologija sa toksikologijom, Biohemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	ugljenične nanocevi; oksidativni stres; apoptoza; pluća; transmisiona elektronska mikroskopija; proantocijanidini; antioksidansi; adenokarcinom; polifenoli; testovi toksičnosti
UDK	61:[66.017:546.26 577.1/.2
Čuva se: ČU	Univerzitet u Novom Sadu, Biblioteka Medicinskog fakulteta, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Vojvodina, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Ugljenične nanocevi (UNC) imaju sve veću primenu u elektronici, kompjuterskoj i optičkoj industriji, kao i u biomedicini. Dok proizvodnja jednoslojnih UNC nanocevi beleži sve veći rast poslednjih godina, rizik koji nosi izlaganje ovom nanomaterijalu ostaje nerazjašnjen. Oskudni i često kontradiktorni podaci o toksičnim efektima jednoslojnih UNC ukazuju na potrebu za daljim ispitivanjima. U našim istraživanjima ispitivane su promene u ćelijskom odgovoru kao i morfološke promene nakon delovanja jednoslojnih ugljeničnih nanocevi na ćelijskoj liniji humanih fetalnih fibroblasta pluća MRC-5 i ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma pluća A549. U ovoj studiji korišćene su jednoslojne ugljenične nanocevi koje su sadržale rezidualne nečistoće poput gvožđa. Citotoksičnost jednoslojnih UNC (engl. <i>single-walled carbon nanotubes</i> – SWCNT) je ispitivana kolorimetrijskim MTT testom. Tokom 24 i 48h niske koncentracije jednoslojnih ugljeničnih nanocevi (<250 µg/mL) pokazale su nisku toksičnost na proliferaciju i vijabilnost u obe ispitivane ćelijske linije. Ipak, pri visokim koncentracijama UNC (250-750 µg/mL) antiproliferativni efekat je bio blizu IC₅₀</p>

	<p>vrednostima. Na osnovu rezultata dobijenih MTT testom može se zaključiti da su maligne A549 ćelije osetljivije na delovanje jednoslojnih UNC u odnosu na normalne MRC-5 ćelije. Kombinacija ugljeničnih nanocevi sa prirodnim polifenolima (resveratrolom i proantocijanidolima) nije značajno uticala na citotoksičnost u MRC-5 ćelijama, za razliku od A549 ćelija gde je tretman kombinacijama umanjio toksičnost ugljeničnih nanocevi. Transmissionom elektronskom mikroskopijom ispitivan je efekat jednoslojnih ugljeničnih nanocevi na ćelijsku morfologiju i preživljavanje. Intracelularni agregati ugljeničnih nanocevi primećeni su u obe ćelijske linije, čime je potvrđeno da ugljenične nanocevi ulaze u ćelije. Imajući u vidu da nanomaterijali poput ugljeničnih nanocevi indukuju oksidativni stres i njime posredovanu apoptozu, na protočnom citometru je određivano prisustvo ćelija u apoptozi i nekrozi. Tretman ćelija sa jednoslojnim ugljeničnim nanocevima nije doveo do značajnog porasta broja apoptotskih ili nekrotičnih ćelija, što ide u prilog niskoj toksičnosti ovog nanomaterijala, odnosno ukazuje na alternativne mehanizme toksičnosti. Međutim kombinacija jednoslojnih ugljeničnih nanocevi sa antioksidantima, resveratrolom i proantocijanidolima indukuje veći procenat apoptoze i nekroze u odnosu na tretman samo sa nanocevima. Promene u ekspresiji gena praćene su lančanom reakcijom polimeraza (PCR). Komparativna analiza rezultata genske ekspresije MRC-5 i A549 ćelija nakon tretmana sa jednoslojnim ugljeničnim nanocevima pojedinačno i u kombinaciji sa antioksidantima ukazala je na kompleksnost i raznolikost biološkog odgovora ispitivanih ćelija. U našem istraživanju ispitivana je i promena aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i količine glutaciona u ćeliji. Primena jednoslojnih ugljeničnih nanocevi u MRC-5 ćelijama dovodi po smanjenja specifične aktivnosti enzima SOD i GR, povećava specifičnu aktivnost GPx i ne utiče na promenu specifične aktivnosti GST i</p>
--	---

	<p>količine glutationa u ćeliji Primena jednoslojnih ugljeničnih nanocevi u A549 ćelijama dovodi po smanjenja specifične aktivnosti enzima SOD, ne utiče na promenu specifične aktivnost enzima GR, GST i GPx, i dovodi do povećanja količine glutationa u ćeliji. Ćelijska vijabilnost, morfološke promene, redoks homeostaza i ekspresija ispitivanih gena bile su promenjene nakon tretmana sa jednoslojnim ugljeničnim nanocevima. Iako su dobijeni rezultati značajni za procenu toksičnosti ugljeničnih nanocevi, neophodna su dalja istraživanja koja treba da doprinesu boljem razumevanju toksičnih efekata ugljeničnih nanocevi.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	23.06.2014.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	Predsednik: Član: Član: Član: Član:

University of Novi Sad
Faculty
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Nikola Jojić
Mentor: MN	Dr sc. med. dr Gordana Bogdanović, senior research associate Doc. dr Branislava Srđenović Čonić, docent
Title: TI	A comparative <i>in vitro</i> study of the carbon nanotubes on normal and cancer lung cells
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English/Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2017
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	University of Novi Sad, Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Physical description: PD	7 chapters / 114 pages / 10 pictures / 30 graphs / 4 tables / 116 references
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pharmacology and toxicology, Biochemistry

Subject, Key words SKW	Nanotubes, Carbon; Oxidative Stress; Apoptosis; Lung; Microscopy, Electron, Transmission; Proanthocyanidins; Antioxidants; Adenocarcinoma; Polyphenols; Toxicity Tests
UC	61:[66.017:546.26 577.1/.2
Holding data: HD	University of Novi Sad, Library of the Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	<p>Carbon nanotubes are being actively introduced in electronics, computer science, and optics as well as for various biomedical applications. While production of single-walled carbon nanotubes (SWCNT) has escalated in recent years, the knowledge on risk associated with exposure remains unclear. Contradictory data on the toxic effects of single-walled carbon nanotubes highlights the urgent need for further studies. In this study we investigated the alterations in cellular response along with morphological changes induced by single-walled carbon nanotubes in human lung fibroblast cell line MRC-5 and adenocarcinoma human alveolar basal epithelial cells A549. In this study we used SWCNT containing large amounts of residual metallic impurities such is iron, and the iron concentration increased in dose dependent manner in cells exposed to SWCNT. Cytotoxicity was evaluated by MTT assay and SWCNT showed little cytotoxic effect on the proliferation and viability of two cell lines tested at the concentrations used (<250 µg/mL) within 24 and 48h. However exposing both cell lines to high concentrations (250-750 µg/mL) resulted in near IC₅₀ values. Based on MTT test SWCNT were more cytotoxic to A549 cell line. Cytotoxicity of SWCNT in combination with natural polyphenols (resveratrol and proanthocyanidins) did not noticeably affect the cytotoxicity of SWCNT to MRC-5 cells. However introduction of polyphenols did reduce the cytotoxicity of SWCNT to A549 cells. Transmission electron microscopy was used to</p>

	<p>complement cytotoxicity assays and to investigate the pathological effect of internalized SWCNT on cell morphology and survival. Intracellular bundles of CNTs, possibly aggregated/agglomerated were observed in both cell lines, confirming internalization after 24h exposure. Since nanoparticles like carbon nanotubes are toxic mainly because they cause oxidative stress, often associated with an increased apoptosis we checked for apoptotic and necrotic cells using flow cytometry. Incubation with SWCNT did not result in pronounced apoptosis or necrosis supporting its low toxicity and possibly alternative mechanism of cell damage. However incubation with SWCNT in combination with resveratrol and proanthocyanidins induced higher levels of both apoptosis and necrosis than SWCNT alone. Changes in gene expression following exposure to SWCNT were evaluated by polymerase chain reaction PCR array which indicated complex and diverse change in expression of genes involved in apoptosis, cell proliferation and oxidative stress. Finally we investigated the modulation of the antioxidant enzyme system and the changes in the cytosolic levels of GSH. SWCNT reduced the specific activity of SOD and GR enzymes, increased GPx activity. No changes in intracellular levels of GSH were observed in MRC-5 cell line. Same treatment in A549 cell reduced the specific activity of SOD, had no effect on GR, GST and GPx activity, but increased intracellular levels of GSH. Cell viability, morphologic changes, redox homeostasis and gene expression were affected by the presence of SWCNT. Although our findings are useful in predicting human response against SWCNT exposure, further study is needed for better understanding of the effects of SWCNT.</p>
Accepted on Senate on: AS	23.06.2014.
Defended: DE	

Thesis Defend Board: DB	President: Member: Member: Member: Member:
----------------------------	--

Ovaj doktorat posvećujem svojoj tetki, Gordani Grubor-Lajšić, čijoj plemenitosti i ljubavi zasvagda ostajem dužnik. Bez tebe ove stranice nikada ne bi bile napisane. Sa velikom ljubavlju pominjem tvoje ime.

Nikola

Ovu stranicu koristim da se zahvalim svima koji su mi nesebično pomagali u ovom životnom poduhvatu.

Veliku, zapravo najveću zahvalnost dugujem dr Gordani Bogdanović, čija su briga, posvećenost i vera u mene bili nepogrešivi putokaz ka srećnom kraju ove priče. Hvala Vam sto sam imao privilegiju da budem Vaš učenik.

Izuzetnu zahvalnost dugujem prof. dr Jeleni Purać iz Laboratorije za biohemiju i molekularnu biologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, koja je do poslednjeg dana izrade ove disertacije bila dostupna za savet, pomoć i podršku. Takođe se zahvaljujem i ostalim članovima tima, prof. dr Danijeli Kojić, dr Snežani Orčić i dr Tatjani Nikolić koji su mi pomogli u realizaciji ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Karmen Stankov koja je svojim znanjem i iskustvom oblikovala ovaj rad i bila njegov idejni tvorac.

Takođe se zahvaljujem dr Dušku Blagojeviću i dr Mihajlu Spasiću iz Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ koji su svojim stručnim savetima i podrškom doprineli kvalitetu ovog rada.

Zahvaljujem se doc. dr Branislavi Srđenović Čonić na korisnim savetima i podršci tokom izrade rada.

Zahvaljujem se dr Vesni Kojić iz Instituta za onkologiju Vojvodine na ukazanoj pomoći i uloženom vremenu i trudu tokom eksperimenata sa ćelijskim kulturama.

Zahvaljujem se prof. dr Tamari Kravić-Stevović i dr Tamari Martinović iz Instituta za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ na pomoći u realizaciji TEM analize.

Srdačno se zahvaljujem prof. dr Silvani Andrić na bezrezervnoj podršci, razumevanju i korisnim savetima tokom pisanja disertacije.

Zahvaljujem se dr Nebojši Pavloviću i dr Bojanu Stanimirovu na pomoći i prijateljstvu tokom svih trenutaka izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Takođe se zahvaljujem dr Slobodanu Gigovu i dr Nikoli Eiću na kolegijalnosti i razumevanju prilikom izrade ovog rada.

Svojoj porodici, mami i bratu koji su mi bili podrška na ovom putu.

Dok iskazujemo svoju zahvalnost, ne smemo zaboraviti da najveći oblik zahvalnosti nije u izricanju reči, nego u životu u skladu sa njima. John Kennedy.

1. UVOD	1
1.1. Reaktivne vrste kiseonika i oksidativni stres	3
1.2. Oksidativni stres kao molekularni mehanizam toksičnosti ugljeničnih nanocevi.....	5
1.3. Oksidativni stres i apoptoza	8
1.3.1. Spoljašnji put apoptoze (engl. „ <i>Extrinsic Apoptotic Pathway</i> “).....	10
1.3.2. Unutrašnji put apoptoze (engl. „ <i>Intrinsic Apoptotic Pathway</i> “).....	11
1.4. Uloga prirodnih polifenola u odbrani od oksidativnog stresa	14
1.4.1. Resveratrol	15
1.4.2. Proantocijanidoli	16
1.4.3. N-acetil cistein	17
1.5. Transmisiona elektronska mikroskopija i SWCNT	18
2. RADNE HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1. Materijal	22
3.1.1. Čelijske kulture	23
3.2. Metode.....	24
3.2.1. Priprema ćelija	24
3.2.2. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija.....	25
3.2.3. Tretman ćelija	26
3.3. Kolorimetrijski MTT test	27
3.3.1. Kontrola kvaliteta MTT testa.....	28
3.4. Transmisiona elektronska mikroskopija.....	28
3.5. Ispitivanje modulacije ćelijskog ciklusa	29
3.6. Određivanje apoptoze.....	29
3.7. Analiza ekspresije gena.....	30
3.7.1. Izolacija ukupne RNK iz ćelija	30
3.7.2. Procena čistoće i kvaliteta uzoraka RNA.....	31
3.7.3. Sinteza komplementarne DNA	31
3.7.4. Relativna kvantifikacija genske ekspresije – RQ-PCR.....	31
3.8. Određivanje koncentracije ukupnih proteina	34

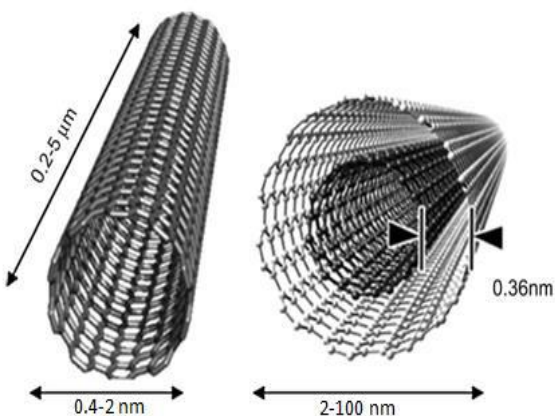
3.9.	Merenje aktivnosti antioksidativnih enzima (AOS).....	34
3.9.1.	Određivanje specifične aktivnosti katalaze (CAT).....	35
3.9.2.	Određivanje specifične aktivnosti superoksid dismutaze (SOD).....	36
3.9.3.	Određivanje specifične aktivnosti glutation S-transferaze (GST)	37
3.9.4.	Određivanje specifične aktivnosti glutation reduktaze (GR).....	38
3.9.5.	Određivanje specifične aktivnosti glutation peroksidaze (GPx).....	39
3.9.6.	Određivanje koncentracije redukovanog glutationa	40
3.10.	Statistička obrada podataka	42
4.	REZULTATI.....	43
4.1.	Rezultati ispitivanja ćelijske proliferacije primenom MTT testa.....	43
4.1.1.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti SWCNT prema MRC-5 ćelijskoj liniji	43
4.1.2.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola prema MRC-5 ćelijskoj liniji.....	44
4.1.3.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti SWCNT, resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola prema MRC-5 ćelijskoj liniji.....	45
4.1.4.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti kombinacije SWCNT (100 µg/mL) sa resveratrolom, N-acetil cisteinom i proantocijanidolima prema MRC-5 ćelijskoj liniji.....	46
4.1.5.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti SWCNT prema A549 ćelijskoj liniji.....	48
4.1.6.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola prema A549 ćelijskoj liniji	49
4.1.7.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti SWCNT, resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola prema A549 ćelijskoj liniji	50
4.1.8.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti kombinacije SWCNT (100 µg/ml) sa resveratrolom, N-acetil cisteinom i proantocijanidolima prema A549 ćelijskoj liniji	51
4.2.	Rezultati analize MRC-5 i A549 ćelija transmisionim elektronskim mikroskopom	53
4.2.1.	Rezultati ispitivanja MRC-5 ćelija transmisionim elektronskim mikroskopom.....	53
4.2.2.	Rezultati ispitivanja A549 ćelija transmisionim elektronskim mikroskopom.....	56
4.3.	Rezultati ispitivanja modulacije ćelijskog ciklusa	58
4.4.	Rezultati ispitivanja apoptoze i nekroze protočnom citometrijom.....	61
4.5.	Rezultati analize ekspresije gena.....	63
4.5.1.	Relativna ekspresija gena čiji su produkti uključeni u antioksidativnu zaštitu i sintezu glutationa.....	63
4.5.2.	Relativna kspresija gena uključenih u proces apoptoze.....	70

4.5.3. Relativna ekspresija gena uključenih u regulaciju ćelijske proliferacije	73
4.6. Rezultati delovanja SWCNT i antioksidanata na specifičnu aktivnost enzima antioksidativne zaštite	76
4.6.1. Specifična aktivnost glutation S-transferaze.....	76
4.6.2. Specifična aktivnost glutation peroksidaze.....	77
4.6.3. Specifična aktivnost glutation reduktaze	78
4.6.4. Specifična aktivnost superoksid dismutaze	79
4.6.5. Specifična aktivnost katalaze.....	79
4.6.6. Količina glutationa.....	80
5. DISKUSIJA	81
6. ZAKLJUČAK	102
7. LITERATURA.....	103

1. UVOD

Nanotehnologija podrazumeva izučavanje i primenu nanočestica, odnosno čestica veličine od 1 do 100 nm [1]. Nanočestice zbog svojih jedinstvenih mehaničkih i fizičko-hemijskih karakteristika nalaze svoju primenu u biotehnologiji, elektronici i kompjuterskoj industriji. Nedavno je započeta primena nanotehnologije i u medicini gde se nanočestice koriste u svrhu dijagnostike, terapije i prevencije humanih oboljenja [2].

Najbolje proučene nanočestice su ugljenične nanocevi, (engl. *carbon nanotubes*) otkrivene 1991. godine od strane Sumio Iijjima [3]. Ugljenične nanocevi članovi su porodice fulerena, sa strukturom dobijenom savijanjem listova grafita u cilindrične cevčice. U zavisnosti od broja cilindara, odnosno grafitnih slojeva koji formiraju koncentrične cevi, ugljenične nanocevi postoje u dva oblika, kao jednoslojne (engl. *single-walled carbon nanotubes* – SWCNT) ili višeslojne (engl. *multi-walled carbon nanotubes* – MWCNT). Dijametar jednoslojnih ugljeničnih nanocevi iznosi svega nekoliko nanometara, dok dijametar višeslojnih ugljeničnih nanocevi zavisi od broja slojeva i obično iznosi 10 nm i više. Dužina ugljeničnih nanocevi uglavnom je nekoliko mikrometara za obe vrste ugljeničnih nanocevi.



Slika 1.1. Jednoslojne (*single-walled*, SWCNTs) i višeslojne (*multi-walled*, MWCNTs) ugljenične nanocevi. Preuzeto i modifikovano prema Tan [4]

Proizvodnja ugljeničnih nanocevi često podrazumeva upotrebu katalitičkih metala (gvožđe, kobalt, nikel) koji tokom procesa proizvodnje zaostaju i često bivaju prisutni unutar i/ili na krajevima ugljeničnih nanocevi. Kako procesi prečišćavanja nemaju ujednačenu efikasnost sadržaj nečistoća takođe varira što uslovljava varijacije u finalnom hemijskom sastavu

ugljičnih nanocevi. Ovi kontaminanti mogu imati značajnu ulogu u biološkoj aktivnosti ugljičnih nanocevi i često su izvor značajne varijacije među ugljičnim nanocevima [5].

Činjenica je da ugljične nanocevi danas imaju sve veću primenu i da se smatraju materijalom 21. veka. Ipak sa druge strane sve rasprostranjenija primena ovog nanomaterijala nosi sa sobom rizik od toksičnih efekata na ljudski organizam. Osim sve veće komercijalne proizvodnje, koja iznosi i nekoliko hiljada tona godišnje, ugljične nanočestice u prirodu dospevaju sagorevanjem fosilnih goriva, ali i prirodnim putem, sagorevanjem metana, propana ili prirodnog gasa [6, 7]. Postoje podaci da su u urbanim gradskim sredinama u vazduhu izmerene koncentracije od 55 ng/m^3 ugljičnih nanocevi [8].

Nanotoksikologija se bavi ispitivanjem toksičnosti nanomaterijala u cilju boljeg razumevanja i bolje procene rizika koji nosi njihova primena. *In vitro* testovi citotoksičnosti su od velikog značaja u ispitivanju efekata ugljičnih nanocevi zbog relativno kratkog trajanja eksperimenta kao i cene u poređenju sa *in vivo* testovima na životinjama.

Dosadašnja saznanja o biološkim efektima ugljičnih nanocevi često su kontradiktorna i zahtevaju dalja ispitivanja. Postoje radovi u kojima se ukazuje na citotoksičnost i mutagenost ugljičnih nanocevi, ali i radovi u kojima se ugljičnim nanocevima ne pripisuju toksična svojstva [9, 10, 11]. Ono što predstavlja najveći problem prilikom procene toksičnosti ovog nanomaterijala jeste što u objavljenim radovima često nedostaju precizne informacije o načinu proizvodnje ugljičnih nanocevi, prisustvu onečišćenja poput katalitičkih metala, funkcionalizaciji i tačnim fizičko hemijskim karakteristikama.

Inicijalna zabrinutost oko upotrebe ugljičnih nanocevi javila se kao posledica strukturne sličnosti sa vlaknima azbesta. Struktura ugljičnih nanocevi omogućava ulazak, deponovanje i zadržavanje ovog nanomaterijala u plućima i pleuri, a zbog svoje bioperzistencije i strukturne sličnosti sa vlaknima azbesta veruje se da može imati biološki štetne efekte.

In vivo eksperimenti sa ugljičnim nanocevima su ukazali na dozno zavisnu pojavu granulomatoznih lezija pluća i perzistentnu intersticijalnu inflamaciju nakon hroničnog izlaganja [12]. Efekti jednoslojnih ugljičnih nanocevi ispitivani su *in vitro* na ćelijama pluća gde je primećeno da ovaj nanomaterijal indukuje apoptozu i smanjuje ćelijsku adheziju kroz regulaciju gena uključenih u ćelijsku smrt, ćelijsku proliferaciju i preživljavanje [13].

Poput navedenih i brojne druge studije na životinjama kao i *in vitro* modeli ukazali su da ugljične nanocevi osim fibrotičnih efekata na pluća pokazuju čitav niz drugih toksičnih efekata

[14]. Danas je poznato da ugljenične nanocevi mogu delovati citotoksično, izazvati inflamaciju, genotoksičnost i modulaciju imunološkog odgovora. Na osnovu ovih saznanja započeta su dalja ispitivanja u cilju utvrđivanja veze između strukture ugljeničnih nanocevi i biološkog odgovora, mehanizma toksičnog delovanja i zdravstvenih rizika koji primena ovog nanomaterijala nosi. Ispitivanjem povezanosti strukture i biološkog odgovora dokazana je veza između toksičnosti ugljeničnih nanocevi sa jedne i veličine, oblika, finalnog hemijskog sastava i površinskih karakteristika sa druge strane. Upravo navedene karakteristike ugljeničnih nanocevi utiču na distribuciju, eliminaciju i njihovu intrinzičku toksičnost. Saznanja o efektima ugljeničnih nanocevi na celularnom, subcelularnom i molekularnom nivou omogućila su bolje razumevanje mehanizama toksičnosti ugljeničnih nanocevi. Takođe danas je poznata uloga ugljeničnih nanocevi u aktivaciji brojnih ćelijskih signalnih puteva kao i uloga ovih signalnih puteva u patološkim efektima ugljeničnih nanocevi, poput tumorogeneze, inflamacije i fibroze [15].

1.1. Reaktivne vrste kiseonika i oksidativni stres

Kao potencijalni molekularni mehanizam toksičnosti ugljeničnih nanocevi smatra se generisanje reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive oxygen species* – ROS) i indukcija oksidativnog stresa. Reaktivne vrste kiseonika definisane su kao reaktivni molekuli ili molekulski fragmenti koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u svojim atomskim odnosno molekularnim orbitalama. Produkcija ROS molekula odigrava se kontinuirano u eukariotskim ćelijama kao posledica ćelijskog metabolizma. Najčešći izvori reaktivnih kiseoničnih vrsta su nepotpuna redukcija molekula kiseonika u elektron transportnom lancu na unutrašnjoj membrani mitohondrija, ili u reakcijama katalizovanim NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) oksidazom (NOX).

Važan izvor nastanka reaktivnih vrsta kiseonika predstavljaju i egzogeni faktori kao što teški metali, antineoplastični i drugi lekovi, UV zračenje, herbicidi, bakterijske infekcije, ali i izlaganje ćelije različitim česticama i vlaknima. Svi navedeni faktori mogu u značajnoj meri povećati generisanje ROS.

Biološki značajnim ROS molekulima smatraju se kiseonični radikali ($O_2^{\cdot-}$, ROO^{\cdot} , RO^{\cdot} , HO^{\cdot}) i kiseonične vrste koje deluju prooksidativno i/ili se lako prevode u radikale (H_2O_2 , $HOCl$, O_3 , 1O_2). Formiranje H_2O_2 u ćeliji rezultat je reakcija posredovanih oksidazama ili dismutacije superoksida anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$). Najčešći izvor $O_2^{\cdot-}$ jeste “curenje“ ovog radikala iz

respiratornog lanca. Hidroksil radikal (HO^\bullet) kao posebno visoko reaktivna vrsta kiseonika može modifikovati purinske i pirimidinske baze molekula DNK, dovesti do cepanja lanaca DNK i posledičnog oštećenja DNK molekula [16]. Reaktivne vrste kiseonika mogu dovesti do promene sekvence DNK molekula i pojave mutacija ili genske amplifikacije. Ove promene unutar DNK molekula mogu aktivirati i signalne puteve u ćeliji koji pokreću program ćelijske smrti ili aktivaciju nekoliko protoonkogenih i/ili inaktivaciju pojedinih tumor supresor gena. Ćelijska smrt kao posledica oštećenja DNK najčešće je posledica procesa apoptoze.

Kako bi se sprečio nastanak oksidativnog stresa i nakupljanje ROS ćelije su razvile sopstveni mehanizam antioksidativne odbrane. Mehanizam antioksidativne zaštite obuhvata nekoliko enzima za detoksifikaciju poput tri izoforme superoksid dismutaze (SOD1, SOD2, SOD3), glutation peroksidazu (GPx), katalazu (CAT), glutation-S-transferazu (GST), glutation reduktazu (GR). U ne-enzimske mehanizme ćelijske odbrane od oksidativnog stresa spadaju glutation (GSH), vitamin C i vitamin E. SOD enzim služi kao „hvatač“ superoksida anjon radikala ($\text{O}_2^{\bullet-}$) i prevodi ga u O_2 i H_2O_2 . Katalaza dalje konvertuje nastali H_2O_2 do H_2O i O_2 . Glutation reduktaza katalizuje konverziju oksidovanog oblika glutationa (GSSG) do redukovanog glutationa (GSH). Glutation-S-transferaza ima glavnu ulogu u reakcijama hvatanja radikala zajedno sa glutationom, dok GPx enzim u kombinaciji sa GSH pomaže u reakciji eliminacije H_2O_2 .

U fiziološkom stanju postoji balans između produkcije ROS i njihove neutralizacije u ćelijskom sistemu, zbog čega obično ne dolazi do oksidativnog stresa. Oksidativni stres javlja se u uslovima narušavanja ovog balansa, kada količina prooksidanata i antioksidanata u ćeliji nije u ravnoteži, odnosno količina prooksidanata postaje veća u odnosu na antioksidante. U stanju oksidativnog stresa ćelijske komponente podležu oksidativnim oštećenjima čime se ugrožava ćelijska vijabilnost. Zapravo ROS koji se tokom oksidativnog stresa nakupljaju u ćeliji obzirom na to da su veoma reaktivni postepeno dovode do oksidativnog oštećenja biomolekula poput proteina, lipida i nukleinskih kiselina.

Formiranje ROS u ćeliji može imati pozitivne ili negativne efekte u konačnom biološkom odgovoru ćelije. Efekat reaktivnih kiseoničnih vrsta na ćelijske funkcije zavisi od njihove količine u ćeliji kao i vremena tokom kojeg su ovi molekuli prisutni u ćeliji. Kada produkcija ROS molekula prevazilazi ćelijske antioksidativne kapacitete, dolazi do razdvajanja lanaca DNK, mutacija DNK molekula, raskidanja peptidnih lanaca unutar proteina, lipidne

peroksidacije i ćelijske smrti [17]. Povišen nivo ROS molekula dovodi se u vezu sa brojnim procesima poput degenerativnih bolesti, hronične aktivacije imunološkog sistema, prevremenog starenja, disfunkcijom imunološkog sistema, apoptoze i ćelijske smrti. Ipak, pri niskim koncentracijama reaktivne vrste kiseonika kao signalni molekuli učestvuju u procesima ćelijskog rasta, diferencijacije, adhezije, regulacije imunološkog odgovora, ali i u borbi ćelije sa patogenim mikroorganizmima tokom procesa fagocitoze. Skorija istraživanja su čak pokazala da je nizak nivo oksidativnog stresa povezan sa produženjem životnog veka organizma [18].

1.2. Oksidativni stres kao molekularni mehanizam toksičnosti ugljeničnih nanocevi

Oksidativni stres jedan je od najčešće opisanih mehanizama toksičnog delovanja ugljeničnih nanocevi. Definisan kao stanje u kome je narušena ravnoteža između generisanja reaktivnih vrsta kiseonika i sposobnosti antioksidativnog sistema da ih ukloni, oksidativni stres rezultira oštećenjem biološki važnih makromolekula.

Oba oblika, i jednoslojne i višeslojne ugljenične nanocevi povećavaju produkciju ROS molekula, što je često praćeno povišenim nivoom oksidativnih markera, utroškom ćelijskih antioksidanata i indukcijom antioksidativnih enzima [19, 20]. Uticaj ugljeničnih nanocevi na generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta pokazan je u eksperimentima na različitim ćelijama uključujući makrofage, bronhijalne i alveolarne epitelne ćelije i fibroblaste u *in vitro* uslovima [21, 22]. Nedovoljna količina vitamina E u ishrani miševa dovela je do umanjenja antioksidativnog kapaciteta, povećane osetljivosti na delovanje jednoslojnih ugljeničnih nanocevi i pojave plućnih lezija [23]. Sa druge strane dodatak antioksidanata doveo je do smanjenja oksidativnog stresa i ekspresije inflamatornih citokina u ćelijama tretiranim sa višeslojnim ugljeničnim nanocjevima [19].

Postoji nekoliko načina na koje ugljenične nanocevi povećavaju produkciju ROS molekula, a danas se kao vodeći uzroci smatraju prisustvo metalnih onečišćenja poput gvožđa, kobalta i nikla, prisustvo specifičnih reaktivnih grupa na površini nanocevi ili neuspešna fagocitoza ovog nanomaterijala.

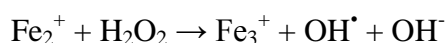
U slučajevima kada su vlakna ugljeničnih nanocevi dugačka, ne postoji mogućnost potpune ingestije od strane makrofaga, jer dijametar vlakna prevazilazi dijametar makrofaga što dovodi do frustrirane fagocitoze. Makrofag, usled nepotpune ingestije, oslobađa sadržaj

fagozoma uključujući digestivne enzime, anti-mikrobne molekule, visoko toksične reaktivne vrste kiseonika kao i reaktivne azotne vrste. Oslobođanje navedenih molekula vodi u inflamaciju i destrukciju okolnih tkiva [22]. Ugljenične nanocevi sa znatno manjom dužinom takođe su sposobne da indukuju generisanje ROS u *in vitro* i *in vivo* uslovima. U ovom slučaju fagocitoza od strane aktiviranih makrofaga neophodna je za indukciju oksidativnog stresa, pri čemu duža i međusobno prepletana vlakna generišu veću količinu ROS molekula u poređenju sa kratkim ugljeničnim nanocevima [20]. Mitohondrije koje su u fiziološkim uslovima glavni izvor ROS molekula u ćelijama sisara, osetljive su na oštećenja toksičnim agensima poput patogenih vlakana. Rezultat ovakvog oštećenja mitohondrija jeste oksidativni stres. I jednoslojne kao i višeslojne ugljenične nanocevi mogu oštetiti mitohondrije i povećati produkciju ROS molekula u ćelijama pluća [21].

Takođe, aktivnošću NOX grupe membranskih enzima dolazi do generisanja superoksida anjona i hidrosil radikala u blizini ćelijske membrane. NOX2 enzim odgovoran je za tzv. “respiratornu eksploziju” (engl. *respiratory burst*) tokom procesa fagocitoze od strane neutrofila i drugih ćelija sa ovom sposobnošću. Utvrđena je uloga NOX2 enzima u tranziciji ugljeničnim nanocevima izazvane inflamacije do hronične fibroze. Naime, kod miševa bez NOX2 enzima nakon izlaganja SWCNT primećen je značajno jači proinflamatorni odgovor, ali ne i profibrotični fenotip u poređenju sa normalnim miševima [24].

Prisutna onečišćenja zaostala tokom procesa proizvodnje poput gvožđa i drugih prelaznih metala mogu pokrenuti Fentonovu ili slične reakcije čiji je krajnji rezultat produkcija ROS i posledični oksidativni stres biološkog sistema.

Fentonova reakcija:



Fenton slična reakcija:



Metalna onečišćenja zaostala tokom procesa sinteze ugljeničnih nanocevi smatraju se vodećim uzrokom nastanka ROS molekula [25, 26].

Osim produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta smatra se da ugljenične nanocevi mogu stimulisati i ekspresiju inducibilne azot oksid sintaze (engl. *inducible nitric oxide synthase* – iNOS, NOS2). Aktivnošću ovog enzima na nivou pluća dolazi do sinteze azot oksida (NO[•]) koji kao gasoviti signalni molekul ima brojne uloge, poput relaksacije glatkih mišića krvnih sudova ili kao neurotransmiter, ali u reakciji sa ROS molekulima može doći do stvaranja snažnih oksidanata poput peroksinitrita (ONOO⁻). Prekomerno generisanje NO[•], ONOO⁻ kao i njihovih derivata koji se kao grupa nazivaju reaktivne azotne vrste (engl. *reactive nitrogen species* - RNS) dovodi do nitrozativnog stresa koji ima svoju ulogu u biološkom odgovoru ćelije [27].

Osim direktnog oštećenja makromolekula i posledične citotoksičnosti i ćelijske smrti, ugljeničnim nanocevima izazvan oksidativni stres posreduje u brojnim ćelijskim procesima poput inflamacije, apoptoze i modulacije signalnih puteva u ćeliji. ROS aktiviraju signalne puteve poput nuklearnog faktora kapa B (NF-κB) signalnog puta i na taj način povećaju produkciju i sekreciju proinflamatornih i profibrotičnih citokina kao i faktora rasta koji doprinose nastanku inflamacije i fibroze [28]. Reaktivne vrste kiseonika kao signalni molekuli učestvuju u regulaciji faktorom rasta stimulisane proliferacije i diferencijacije fibroblasta u fibrogenom odgovoru ćelije na delovanje ugljeničnih nanocevi. ROS se dovode u vezu sa prenosom signala epidermalnog faktora rasta i trombocitnog faktora rasta u stimulaciji ćelijske proliferacije kao i aktiviranju ćelijskih programa poput autofagije [24].

Aktivacija mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) i nuklearnog faktora kapa B povezana je sa patogenezom fibroze pluća [29]. Nakon delovanja jednoslojnih ugljeničnih nanocevi i generisanja hidroksil radikala dolazi do aktivacije MAPK, NF-κB i Akt signalnih puteva povezanih sa ćelijskom proliferacijom i tumorskom progresijom *in vitro* [30].

Interesantni rezultati ukazuju da se oksidativni stres može smatrati mehanizmom koji doprinosi biodegradaciji ugljeničnih nanocevi. Jednoslojne ugljenične nanocevi podležu oksidativnoj biodegradaciji uz pomoć mijeloperoksidaza, prooksidativnog enzima uključenog u odbrambene mehanizme ćelije [31].

Imajući u vidu sposobnost ugljeničnih nanocevi da se zadržavaju u organizmu, može se očekivati da u tkivima u kojima je došlo do deponovanja ovog nanomaterijala dolazi do kontinuirane produkciju ROS molekula i dugotrajnog oksidativnog stresa. Zbog toga čak i primena antioksidanata sa ciljem supresije produkcije ROS ne bi bila dovoljna efikasna u

prevenciji ugljeničnim nanocevima izazvane fibroze u slučajevima dugotrajnog zadržavanja ovog nanomaterijala u organizmu.

1.3. Oksidativni stres i apoptoza

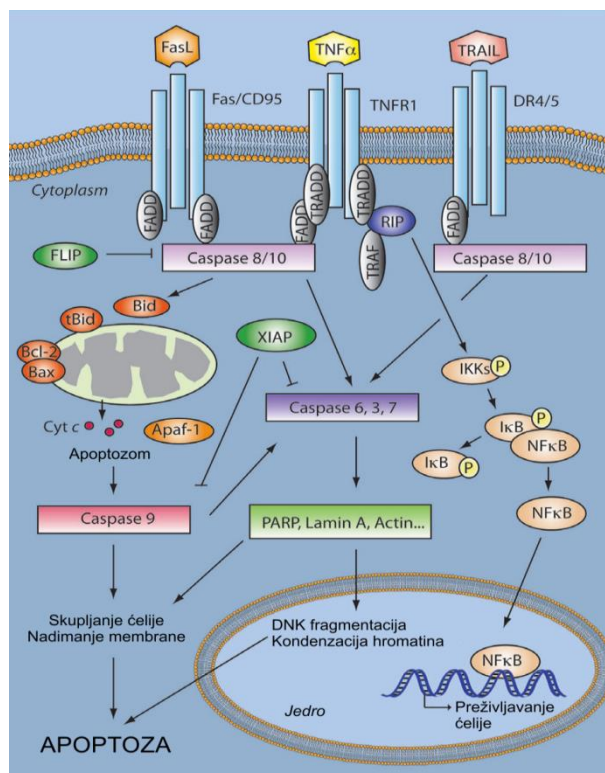
Kao posledica intracelularnog oštećenja i aktivacije kompleksnih signalnih puteva, ćelija pokreće program „samouništenja“ odnosno apoptoze. Ovakav oblik ćelijske smrti regulisan je i aktivan proces, zbog čega se apoptoza često opisuje i kao programirana ćelijska smrt. Proces autofagije takođe je regulisan i aktivan način umiranja ćelija, ali proteinima različitim od apoptoze, zbog čega bi trebalo izbegavati korišćenje termina programirana ćelijska smrt samo za apoptozu. Za razliku od apoptoze i autofagije, nekroza je najčešće neuređen i pasivan tip ćelijske smrti koji nastaje usled narušavanja ćelijskih homeostatskih mehanizama. Apoptoza je fiziološki proces koji se normalno javlja u toku embriogeneze i ima ključnu ulogu u razvoju višćelijskih organizama i održavanju homeostaze tkiva.

Proces apoptoze prvi put je opisan 1972. godine, a sam naziv potiče od grčkih reči apo + pto = opadanje lišća, apoptoza = raspadanje. Podjednako važna kao ćelijska deoba ili migracija, apoptoza omogućava organizmu strogu kontrolu broja ćelija, veličinu tkiva, ali i zaštitu od potencijalno opasnih ćelija koje mogu narušiti homeostazu [32, 33].

Apoptoza zahteva aktivaciju proteolitičkih enzima, kaspaza, čijom aktivnošću nastaju specifične biohemijske i morfološke promene. Karakteristične morfološke promene u procesu apoptoze su bubrenje ili „penušanje“ ćelijske membrane (engl. „*blebbing*“), unakrsno povezivanje proteina i smanjenje ćelijskog volumena i translokacija molekula fosfatidil-serina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane. Upravo premeštanje molekula fosfatidil serina predstavlja signal za fagocitozu od strane makrofaga, čime se sprečava nastanak inflamacije i oštećenje okolnih ćelija. Takođe, proces apoptoze karakterišu i kondenzacija hromatina, oligonukleozomalna fragmentacija DNK prvo u veće segmente, a zatim u nukleozomalne fragmente i konačno formiranje velikih citoplazmatičnih vezikula – apoptotskih telašaca koja se otkidaju od ćelijske površine i uklanjaju od strane fagocita [34].

U ćelijskoj citoplazmi kaspaze se nalaze u neaktivnom obliku kao proenzimi, a mogu se aktivirati autokatalitički ili uz pomoć druge kaspaze. Svoju potpunu proteolitičku aktivnost postižu kao tetrameri koji nastaju nakon dvostrukog cepanja. Stepennasta razgradnja u kojoj jedna kaspaza može aktivirati druge kaspaze, ali i samu sebe, pojačava apoptotski signalni put i dovodi

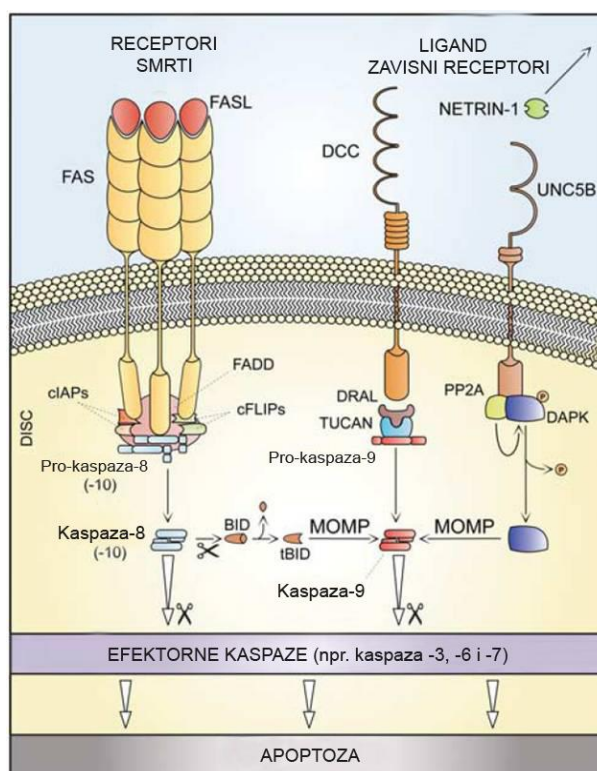
do vrlo brze smrti ćelije. Centralnu ulogu u ovom procesu ima kaspaza-3. Tokom apoptoze kaspaza-3 je odgovorna, delom ili u potpunosti, za postepenu razgradnju velikog broja ćelijskih proteina, fragmentaciju DNK i kondenzaciju hromatina [35]. Proces apoptoze i aktivacija kaspaza se može pokrenuti na dva načina, odnosno dva puta ekstracelularnim ili intracelularnim. Ekstracelularni signali podrazumevaju vezivanje liganda za ćelijske površinske receptore koji se nazivaju „receptori smrti“. Pokretanje intracelularnih signala posledica je različitih oblika ćelijskog stresa poput oštećenja molekula DNK ili narušavanje strukture mikrotubula [36]. Oba puta se sprovode aktiviranjem enzima cistein aspartat proteaza, odnosno kaspaza. Apoptoza kao oblik ćelijske smrti praćena je snažnom aktivacijom serin/treonin kinaze Akt, ERK1 i ERK2 kinaze (engl. *extracellular signal-regulated kinases*), p38 i c-Jun kinaze (engl. *c-Jun NH2-terminal kinase*). Aktivacija kaspaza strogo je regulisana od strane različitih polipeptida, uključujući porodicu Bcl-2 proteina, inhibitora proteina apoptoze kao i nekoliko protein kinaza [37].



Slika 1.2. Regulacija apoptoze. Preuzeto i modifikovano prema Krakstad [38]

1.3.1. Spoljašnji put apoptoze (engl. „*Extrinsic Apoptotic Pathway*“)

Spoljašnji put započinje aktivacijom transmembranskih receptora iz TNF/Fas porodice koji se nazivaju receptori smrti (engl. *death receptors*). Receptori smrti imaju cisteinom bogat ekstracelularni deo i intracelularni, citoplazmatski deo, koji se naziva domen smrti (engl. *death domain*). U putevima prenosa signala smrti sa površine ćelije do njene unutrašnjosti glavnu ulogu upravo imaju ovi domeni. Do aktivacije receptora smrti dolazi nakon vezivanja odgovarajućeg liganda, kao što su FasL i TNF- α . Vezivanjem Fas liganda za Fas receptor, tri ili više Fas molekula se trimerizuju, a njihovi domeni smrti formiraju vezno mesto za adaptorski protein nazvan FADD (engl. *Fas-associated death domain*). FADD molekul u kompleksu sa domenom smrti vezuje za sebe nekoliko neaktivnih kaspaza 8, koje se međusobno grupišu što dovodi do njihove aktivacije [39]. Vezivanjem TNF-liganda za TNFR1 receptor se takođe pokreće sličan put, osim što su u ovom slučaju kao adapterski molekul pojavljuje TRADD protein (engl. *TNFR-Associated Death Domain*), koji ima sposobnost vezivanja različitih proteina na aktiviranom delu receptora.



Slika 1.3. Spoljašnji mitohondrijalni put apoptoze. Preuzeto i modifikovano prema Galluzzi [39]

Vezivanjem liganda za odgovarajuće receptore aktiviraju se tzv. „uzvodne“ kaspaze, kao što su kaspaza-8 ili -10, koje proteolizom aktiviraju tzv. „efektorse“ kaspaze, -3, -6 i -7. Jednom aktivirane, efektorske kaspaze razgrađuju čitav niz proteina neophodnih za život ćelije i dovode do većine morfoloških promena koje nastaju tokom apoptotskog procesa [35].

1.3.2. Unutrašnji put apoptoze (engl. „*Intrinsic Apoptotic Pathway*“)

Centralno mesto u pokretanju unutrašnjeg puta apoptoze imaju mitohondrije, koje integrišu signale smrti koji potiču iz ćelije. Ovi signali posledica su različitih oštećenja, odnosno stresa u pojedinim organelama, npr. jedru, endoplazmatskom retikulumu ili Goldžijevom aparatu. U prisustvu ovakvih signala u ćeliji dolazi do narušavanja integriteta mitohondrijalnih membrana, smanjenja mitohondrijalnog transmembranskog potencijala i oslobađanja u citosol grupe proapoptotskih proteina koji se normalno nalaze u intermembranskom prostoru. Oslobađanje ovih faktora narušava biohemijsku homeostazu ćelije, prekida se sinteza ATP molekula, dolazi do oksidacije NADH, NADPH i glutationa i prekomerne produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta. Generisanje velike količine ROS neminovno dovodi do oksidacije lipida, proteina i nukleinskih kiselina i njihovog oštećenja. Jedan od molekula koji napušta mitohondrije je i citohrom-C (Cyt C) koji se vezuje za jedan citoplazmatski protein APAF-1 (engl. *Apoptosis Protease-Activating Factor-1*) dovodeći do njegove konformacione promene i omogućavajući aktivaciju enzima kaspaze-9 [35]. Citohrom C je protein prisutan u intermembranskom prostoru mitohondrija, tačnije na spoljašnjoj strani unutrašnje mitohondrijalne membrane vezan za anjonski mitohondrijalni fosfolipid kardiolipin. Danas se zna da oksidativni stres smanjuje afinitet kojim se kardiolipin vezuje za citohrom C i omogućava mobilizaciju citohroma C sa unutrašnje mitohondrijalne membrane, što dovodi do oslobađanja citohroma C u citosol kroz pore mitohondrijalne membrane [34]. Nakon oslobađanja u citosol, citohrom C vezuje se za APAF-1 protein (apoptoza aktivirajući faktor-1) i formira heksamernu strukturu koja se naziva apoptozom. Citohrom C-APAF-1 kompleks vezuje za sebe kritičnu inicijalnu kaspazu mitohondrijalnog puta, kaspazu 9, aktivira je i pokreće proces aktivacije drugih prokaspaza koje učestvuju u egzekucionoj fazi apoptoze.

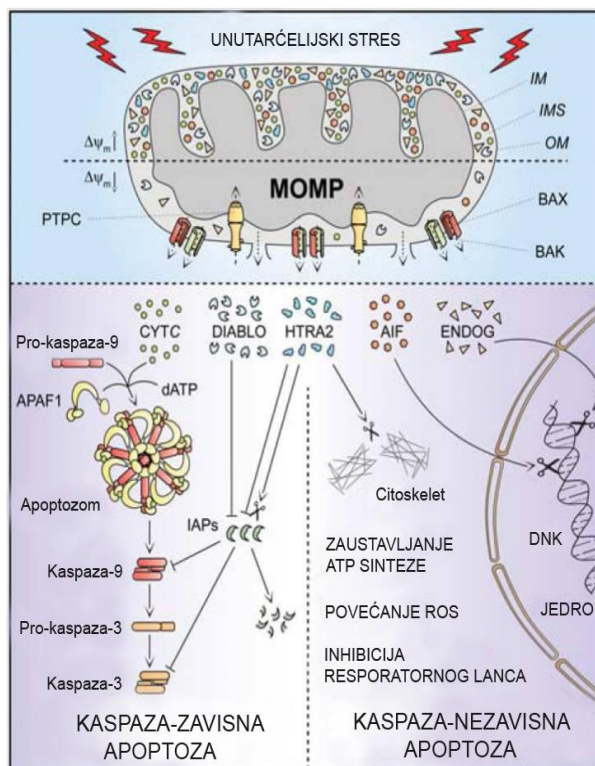
Pored Cyt C, mitohondrije sadrže i druge apoptotske faktore kao što su AIF (engl. *Apoptosis-Inducing Factor*) i endonukleaza-G. AIF iz mitohondrija prelazi u jedro ćelije i nezavisno od kaspaza dovodi do fragmentacije DNK na fragmente veličine od 50 – 300 kb, dovodeći tako do

kondenzacije hromatina uz jedarnu membranu. Endonukleaza-G izlazi iz mitohondrija tokom apoptoze i delimično je odgovorna za internukleozomalnu hidrolizu DNK, koja je takođe nezavisna od kaspaza [35].

Oslobađanje mitohondrijalnih proapoptotskih molekula strogo je kontrolisano od strane Bcl2 familije proteina koja broji preko 20 različitih proteina razvrstanih u tri grupe na osnovu proapoptotskih, anti-apoptotskih funkcija, kao i Bcl2 homologije.

- Anti-apoptotski: Bcl2, Bcl-xL, BCL-W, A1-Bfl-1 i MCL1 glavni su predstavnici ove grupe. Lokalizovani su u mitohondrijalnim membranama, citosolu kao i membranama ER-a, a osnovna uloga im je da očuvaju nepropustljivost mitohondrijalne membrane i onemoguće „curenje“ citohroma C i drugih proteina u citosol.
- Proapoptotski: Bax, Bak Bcl-x_s, Bok/Mtd glavni su predstavnici ove grupe. Nakon aktivacije Bax i Bak proteina i njihove oligomerizacije povećava se propustljivost spoljašnje membrane mitohondrija. Tačan mehanizam ovog procesa nije još uvek razjašnjen. Jedna od teorija ukazuje da ova dva proteina formiraju kanal u spoljašnjoj membrani mitohondrija omogućavajući izlazak citohroma C iz međumembranskog prostora.
- Senzori: Bad, Bim, Bid, Puma i Noxa deluju kao senzori i regulišu balans između prve dve grupe proteina [40].

Narušen balans između količine ROS i endogenih antioksidanata uvodi ćeliju u stanje oksidativnog stresa i apoptoze. Reaktivne vrste kiseonika snažni su aktivatori ASK1 (engl. *apoptosis signal-regulating kinase 1*). Poznato je da različiti oblici ćelijskog stresa poput antineoplastičnih lekova i UV zračenja aktiviraju ASK1 upravo produkcijom ROS, čime se u ćeliji pokreće proces apoptoze. Kao redoks senzor ASK1 je osetljiv na stepen i trajanje oksidativnog stresa i usmerava ćeliju ka apoptozi samo u slučaju kad oksidativnim stresom nastala oštećenja prevazilaze mehanizme reparacije ćelije. Zbog svoje uloge u redoks signalnim putevima, sudbina ćelije poput preživljavanja, diferencijacije ili apoptoze regulisana je upravo ASK1 kinazom [41].



Slika 1.4. Unutrašnji mitohondrijalni put apoptoze. Preuzeto i modifikovano prema Galluzzi [39]

Određivanje markera apoptoze, aktivnosti kaspaza i ekspresije proapoptotskih i antiapoptotskih proteina je važan segment u proceni citotoksičnosti nanočestica. Većina radova u kojima su opisani rezultati proteinskog profila ćelija nakon izlaganja ugljeničnim nanocevima i drugim nanomaterijalima je pokazala veću ekspresiju p53 protein zavisnog i/ili kaspaza zavisnog proapoptotičnog puta što je generalno povezano sa oksidacionim stresom, odnosno povećanom ekspresijom (engl. *up-regulation*) gena uključenih u oksidativni stres ili drugih, na oksidativni stres osetljivih proteina [30, 42]. Da su oksidativni stres i apoptoza tesno povezani u specifičnom citotoksičnom odgovoru na izlaganje ugljeničnim nanocevima potvrđuju ne samo podaci proteomike, već i lipidomike, sa lipidnom peroksidacijom kao posledicom proapoptotskog delovanja jednoslojnih ugljeničnih nanocevi [24].

1.4. Uloga prirodnih polifenola u odbrani od oksidativnog stresa

Prekomerno nakupljanje reaktivnih vrsta kiseonika u ćeliji i/ili oslabljen antioksidativni odbrambeni sistem dovode do narušavanja redoks statusa u ćeliji i uvodi je u stanje oksidativnog stresa. Aktivacija enzima antioksidativne zaštite poput katalaze, superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i glutation reduktaze predstavlja mehanizam odbrane ćelije od oksidativnog stresa, a uloga ovih enzima jeste ponovno uspostavljanje oksidativnog ekvilibrijuma [43]. Međutim u prisustvu velike količine ROS molekula ovaj odbrambeni mehanizam često nije dovoljno efikasan u zaštiti ćelije od oksidativnog stresa, zbog čega danas postoji sve veće interesovanje za primenu jedinjenja sa antioksidativnim delovanjem. Antioksidantima se smatraju jedinjenja koja mogu da uspore ili preveniraju oksidaciju drugih molekula.

Polifenolna jedinjenja se u ćelijama biljaka sintetišu kao sekundarni metaboliti kao deo ćelijskog odgovora na stres poput mehaničke povrede, gljivične infekcije ili UV zračenja, i predstavljaju odbrambeni mehanizam biljaka. Prirodni polifenoli smatraju se snažnim antioksidantima u *in vitro* uslovima zbog svoje sposobnosti da doniraju elektron ili atom vodonika velikom broju reaktivnih vrsta kiseonika, azota i hlora, poput hidroksil radikala (HO^\bullet), superoksid anjon radikala ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroksil radikala (RO_2^\bullet), hipohloraste kiseline (HOCl) i peroksinitritne kiseline (ONOOH). Kao "hvatači" radikala prirodni polifenoli mogu prekinuti fazu propagacije lančane reakcije lipidne autooksidacije. Takođe prirodni polifenoli deluju kao helatori metala u konverziji hidroperoksida ili metalnih prooksidanata u stabilna jedinjenja. Kao helatori metala mogu direktno inhibisati redukciju trovalentnog gvožđa (Fe^{3+}) i na taj način sprečiti nastanak reaktivnog hidroksil radikala u Fenton-ovoj reakciji [44]. Takođe prirodni polifenoli mogu doprineti uspostavljanju redoks homeostaze povećavajući aktivnost enzima antioksidativne zaštite poput SOD, CAT, GPx i GR. Ekspresija ovih antioksidativnih enzima modulirana je transkripcionim faktorom Nrf-2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) koji može biti aktiviran u prisustvu reaktivnih vrsta kiseonika. Nrf-2 nakon translokacije u jedro i vezivanja za DNK posreduju u transkripciji gena za enzime antioksidativne zaštite. Nrf-2 – Keap1 signalni put učestvuje u kontroli modulacije redoks homeostaze i detoksifikacije. Prirodni polifenoli mogu indukovati aktivaciju Nrf-2 puta i na taj način povećati ekspresiju ćelijskih antioksidativnih enzima [45]. Takođe, prirodni polifenoli mogu umanjiti oksidativni stres modulacijom inflamatornih signalnih puteva koji su pod kontrolom nuklearnog faktora kapa B i mitogenom aktivirane protein kinaze [46].

1.4.1. Resveratrol

Resveratrol je fitoaleksin prisutan u brojnim biljkama, uključujući i biljke koje se danas koriste u humanoj ishrani, poput grožđa i kikirikija, a u biljkama se sintetise kao odgovor na stres, kakva je na primer mehanička povreda. Brojna *in vitro* ispitivanja ukazala su da resveratrol ispoljava anti-tumorska svojstva, odnosno da štiti ćeliju od tumorske inicijacije i tumorske progresije. Resveratrol može dovesti do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i apoptoze tumorskih ćelija, zaustaviti rast tumora i njegovu migraciju smanjenjem ekspresije tumorske azot oksid sintaze, ali i delovati kao antioksidant i na taj način prevenirati oštećenje molekula DNK i sprečiti formiranje tumora [47]. Resveratrol takođe inhibiše aktivnost enzima ciklooksigenaze (COX) čija uloga u tumorogenezi je poznata konverzijom arahidonske kiseline do prostaglandina, inflamatornih medijatora koji promovišu proliferaciju tumorskih ćelija.

Resveratrol inhibiše rast ćelija humanog adenokarcinoma pluća (A549) i izaziva dozno zavisni prekid S faze ćelijskog ciklusa. Fluorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom ukazano je da tretman ovih ćelija resveratrolom indukuje proces apoptoze. Efekti na izazivanje apoptoze koreliraju sa aktivacijom kaspaze-3 i pomeranjem Bax/Bcl-xL ravnoteže u pravcu apoptoze [48].

Za resveratrol je poznato da modulira aktivnost NFκB porodice transkripcionih faktora, koja posreduje u transkripciji gena odgovornih za rast tumora. Transkripcioni faktori iz ove porodice uglavnom su prisutni u ćelijskoj citoplazmi u interakciji sa inhibitorom κB (IκB) koji onemogućava njihovu nuklearnu translokaciju [49]. Nakon degradacije IκB, NFκB migrira u jedro gde dolazi do vezivanja za DNK promotor regije brojnih gena čiji su proteinski proizvodi uključeni u patogenezu procesa inflamacije. Tačan mehanizam na koji resveratrol interferira sa aktivnošću NFκB transkripcionog faktora još uvek nije potpuno razjašnjen. Postoje hipoteze o ulozi resveratrola u smanjenju prisustva ovog transkripcionog faktora u jedru. Takođe jedan od predloženih mehanizama jeste resveratrolom posredovana inhibicija proinflamatornih medijatora poput faktora nekroze tumora (TNF), lipopolisaharida i vodonik peroksida (H₂O₂) koji dovode do fosforilacije i degradacije IκB, čime se onemogućava NFκB nuklearna translokacija [50]. Moguće je da u cilju sprečavanja nuklearne translokacije NFκB resveratrol dovodi do inhibicije aktivnosti IκB kinaze (IKK) [51].

Resveratrol svoje efekte ostvaruje i aktivacijom NAD⁺-zavisnih histon deacetilaza koje pripadaju klasi sirtuina. Sirtuini regulišu određen broj unutarćelijskih signalnih

puteva aktiviranjem transkripcionih faktora i enzima koji reaguju na dostupnost nutrijenata. Glavni sirtuin aktiviran resveratrolom je Sirt1 koji učestvuje u mnogim vitalnim procesima, kao što su popravka DNK, preživljavanje ćelije, glukoneogeneza, diferencijacija mišićnih ćelija, regulacija ćelijskog ciklusa, metabolizam lipida i osetljivost na insulin [52].

1.4.2. Proantocijanidoli

Flavonoidi su široko rasprostranjeni sekundarni metaboliti biljaka koji imaju važnu ulogu u fiziologiji biljaka i ispoljavaju brojne biološki značajne efekte poput antioksidativnog, antiinflamatornog, antitumorskog, antibakterijskog i antivirusnog delovanja.

Proantocijanidoli su klasa flavonoida koji nastaju kao proizvodi polimerizacije flavan-3-ola do oligomera. Strukturno, proantocijanidoli sadrže jedan ili više aromatičnih prstena sa jednom ili više hidroksilnih grupa koje mogu stupiti u interakciju sa kiseoničnim radikalima i formirati rezonantno stabilni fenoksil radikal. Takođe, kateholna struktura proantocijanidola omogućava heliranje tranzicionih metala poput bakra i gvožđa, koji imaju važnu ulogu u ćelijskom redoks sistemu. Zbog svoje strukture, proantocijanidoli ispoljavaju snažan antioksidativni efekat i mogu sprečiti peroksidaciju i nastanak oksidativnih oštećenja unutar ćelije [53]. Proantocijanidoli moduliraju aktivnost nekoliko regulatornih enzima, poput ciklooksigenaze, lipooksigenaze, angiotenzin konvertujućeg enzima i hialouronidaze kako bi se u ćeliji ograničila produkcija reaktivnih vrsta kiseonika. Takođe, proantocijanidoli moduliraju aktivnost kao i gensku ekspresiju nekoliko izoformi citohroma P450 [54].

Predloženi mehanizmi antitumorskog delovanja proantocijanidola obuhvataju njihovo antioksidantno i antiproliferativno delovanje. Na subcelularnom nivou, proantocijanidoli učestvuju u regulaciji brojnih signalnih puteva u ćeliji i mogu indukovati zaustavljanje ćelijskog ciklusa i apoptozu. U procesu pokretanja apoptoze kao oblika programirane ćelijske smrti, proantocijanidoli u tumorskim ćelijama povećavaju ekspresiju proapoptotskog Bax proteina i tumor supresorskog proteina p53. Sa druge strane u prisustvu proantocijanidola dolazi do smanjenja ekspresije antiapoptotskih proteina Bcl-2 i Bcl-xl uz istovremeno oslobađanje citohroma C iz mitohondrija u citosol [55].

Zanimljivo je da su proantocijanidoli pokazali značajan protektivni efekat na zdrave ćelije, nakon primene hemioterapeutika i stresom indukovane citotoksičnosti. U osnovi protektivnog delovanja je povećanje ekspresije antiapoptotskog Bcl-xl gena, odnosno modulacija

p53 i Bcl-2 gena čime se ćelija štiti od apoptoze. Tretman ćelija sa proantocijanidolima inhibiše prekomernu ekspresiju Bax proteina, smanjuje oslobađanje citohroma C iz mitohondrija i posledičnu aktivaciju kaspaza-9, -7 i -3 [56]. Brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja pokazala su da proantocijanidoli moduliraju redoks status u ćeliji i aktivnost enzima antioksidativne zaštite. Proantocijanidoli poboljšavaju oksidativni metabolizam ćelija jetre pacova u *in vitro* uslovima i povećavaju kako ekspresiju glutathion peroksidaze i glutathion reduktaze, tako i njihovu specifičnu aktivnost u ćelijama hepatokarcinoma [54].

1.4.3. N-acetil cistein

N-acetilcistein je efikasan hvatač slobodnih radikala, a takođe i značajan faktor u regulaciji GSH/GSSG homeostaze. Korigovanjem ili prevencijom potrošnje GSH molekula u ćeliji, NAC ispoljava svoje antioksidativne efekte.

Ključnu ulogu u održavanju intracelularne GSH/GSSG homeostaze ima redoks sistem glutathiona, jedan od najznačajnijih antioksidativnih mehanizama ćelije neophodan za normalno odvijanje brojnih fizioloških procesa. Redoks sistem glutathiona kao supstrat koristi redukovani glutathion (GSH) u reakciji detoksifikacije peroksida poput H_2O_2 i lipidnih peroksida uz učešće glutathion peroksidaze. U ovoj reakciji dolazi do generisanja oksidovanog glutathiona (GSSG), koji se nakon toga uz pomoć glutathion reduktaze redukuje do GSH molekula.

GSH molekul ima brojne uloge u ćeliji kao što su: antioksidativna zaštita, detoksifikacija elektrofilnih ksenobiotika, modulacija redoks zavisne signalne transdukcije, deponovanje i transport cisteina, regulacija ćelijske proliferacije, regulacija imunološkog odgovora, regulacija metabolizma leukotrijena i prostaglandina [57].

Održavanje GSH/GSSG odnosa preko 90% umanjuje nakupljanje disulfidnog (oksidovanog) oblika glutathiona i omogućava redukujuću sredinu unutar ćelije. Međutim, u uslovima generisanja velike količine reaktivnih vrsta kiseonika dolazi do narušavanja GSH/GSSG odnosa što utiče na brojne signalne puteve u ćeliji i dovodi do njihove aktivacije.

Od tri aminokiseline koje ulaze u sastav glutathiona (glutamat, glicin i cistein) cistein ima najnižu intracelularnu koncentraciju. Dostupnost ove tri aminokiseline glavni je regulator sinteze GSH molekula, pri čemu su ćelijske koncentracije glutamata i glicina visoke, pa je sinteza glutathiona zapravo zavisna od dostupnosti cisteina. U uslovima smanjene sinteze ili povećane potrošnje, nivo GSH u ćeliji može se povećati ukoliko se ćeliji obezbedi dodatna količina

cisteina. Ipak aktivna forma cisteina, L-cistein zahteva poseban oblik transporta prilikom prolaska kroz ćelijske membrane, za razliku od N-acetilcisteina (NAC) koji ne zahteva aktivni transport za ulazak u ćeliju. Iako hemijski slični, prisustvo acetil grupe u molekulu N-acetilcisteina smanjuje njegovu reaktivnost, čineći ga manje toksičnim od cisteina, otpornijim na procese oksidacije i dimerizacije i rastvorljivijim u vodi. Nakon ulaska u ćeliju, NAC podleže brzom hidrolizi i dolazi do oslobađanja cisteina, prekursora GSH molekula.

Navedeni razlozi čine NAC boljim izvorom cisteina nego primena samog cisteina [58]. Nakon povećane dostupnosti cisteina u ćeliji, delovanjem enzima glutamilcistein sintetaze i glutathion sintetaze dolazi do sinteze glutathiona u ćeliji.

1.5. Transmisiona elektronska mikroskopija i SWCNT

Dosadašnja saznanja o citotoksičnosti jednoslojnih ugljeničnih nanocevi vrlo su oskudna i često kontradiktorna zbog čega je uočena potreba za uvođenjem alternativnih metoda ispitivanja citotoksičnosti i načina na koji ugljenične nanocevi dospevaju unutar ćelije. Primena transmisione elektronske mikroskopije (TEM) pružila je saznanja o translokaciji ugljeničnih nanocevi u ćelije, njihovoj unutarćelijskoj lokalizaciji i migraciji kao i sudbini nakon dospeća u ćeliju. Poteškoće prilikom TEM analize predstavljaju sličnosti u dimenzijama i kompoziciji između ugljeničnih nanocevi i organela koje su bogate ugljenikom [59].

Jednoslojne ugljenične nanocevi su hidrofobne, tubularne nanostrukture sa dijametrom od svega nekoliko nanometara. Veličina jednoslojnih ugljeničnih nanocevi mnogostruko je manja od pora jedarnog kompleksa, a otprilike iste veličine kao pore koje formiraju jonske kanale i tesne veze (engl. *gap junction*) koje omogućavaju prolazak molekula unutar, odnosno izvan ćelije. Upravo zbog sličnosti u veličini sa ovim ćelijskim strukturama postoji zabrinutost da jednoslojne ugljenične nanocevi mogu ući u ćeliju kroz lipidni dvosloj i stupiti u interakciju sa ćelijskim organelama, pa čak i jedrom [60].

Tačan mehanizam kojim jednoslojne ugljenične nanocevi ulaze u ćeliju još uvek nije potpuno razjašnjen, ali postoje podaci o prolasku ćelijskih membrana procesom endocitoze ili zabadanjem u ćelijsku membranu i ulasku u ćeliju procesom difuzije. Istraživanja na humanim makrofazima pokazala su da je većina jednoslojnih ugljeničnih nanocevi nakon ćelijskog tretmana lokalizovana unutar fagozoma i lizozoma, što sugeriše na proces fagocitoze. Ipak, prisustvo nanocevi u citoplazmi ukazuje da je osim fagocitoze, moguć i pasivan prolazak kroz

lipidnu membranu. U istom eksperimentu sa makrofazima, iako u niskim koncentracijama SWCNT su primećene i u jedru. Upravo prisutvo ugljeničnih nanocevi u citoplazmi i jedru ukazuje na moguću interakciju sa intracelularnim proteinima, organelama i DNK molekulima što svakako u značajnoj meri povećava toksični potencijal ovog nanomaterijala.

Dodatna prednost transmisiona elektronske mikroskopije jeste jasno uočavanje ultrastrukturnih promena unutar ćelije, koje jasno ukazuju na način ćelijske smrti.

Posebno su zanimljivi podaci koji ukazuju na mogućnost ugljeničnih nanocevi da zabadanjem u ćelijsku membranu postignu konfiguraciju transmembranskog proteina (npr. u obliku kanala) koji su sposobni za razmenu ćelijskog sadržaja. Delovanjem van der Valsovih sila ugljenične nanocevi mogu ekstrahovati velike količine fosfolipida prisutnih u ćelijskoj membrani [61].

2. RADNE HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Uvođenje nanotehnologije u medicinu obavezuje na sveobuhvatno ispitivanje bioloških efekata delovanja nanomaterijala, kako na čoveka tako i na njegovo okruženje. Činjenica da ugljenične nanocevi indukuju oksidacioni stres i njime uslovljenu apoptozu, nameće potrebu daljih istraživanja uloge tako izazvanog „oksidacionog stresa“, ne samo sa aspekta njegove odgovornosti za toksične efekte nanočestica, već i u cilju regulatorne (signalne) uloge oksido-redukcionih reakcija i potencijalnog specifičnog i selektivnog delovanja na normalne odnosno maligne ćelije. Bolje razumevanje prirode i značaja biološkog odgovora na prisustvo nanočestica u ćeliji pružiće nove mogućnosti kontrole njihove distribucije, degradacije, toksičnosti i primene. Predmet našeg istraživanja je dalje razumevanje efekata jednoslojnih ugljeničnih nanocevi (engl. *single-walled carbona nanotubes* SWCNT) u smislu citotoksičnosti i indukcije apoptoze, i u tom smislu postavljeni su sledeći ciljevi našeg istraživanja:

- Ispitati citotoksičnost ugljeničnih nanocevi u malignim ćelijama pluća (A-549) i normalnim fetalnim ćelijama plućnih fibroblasta (MRC5) i kombinacije nanocevi i antioksidanata.
- Odrediti aktivnost enzima antioksidativne zaštite u malignim ćelijama pluća (A-549) i normalnim fetalnim ćelijama plućnih fibroblasta (MRC5) tretiranih ugljeničnim nanocevima i kombinacijom nanocevi i antioksidanata.
- Utvrditi ekspresiju odabranih gena čiji su produkti uključeni u proces apoptoze, regulacije proliferacije i antioksidativnu zaštitu u malignim ćelijama pluća (A549) i normalnim fetalnim ćelijama plućnih fibroblasta (MRC-5) tretiranih ugljeničnim nanocevima i kombinacijom nanocevi i antioksidanata.

Radne hipoteze našeg istraživanja su:

- Prisustvo antioksidanata značajno smanjuje toksičnost ugljeničnih nanocevi
- Promene u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i količine glutaciona u malignim ćelijama pluća (A-549) i normalnim fetalnim ćelijama plućnih fibroblasta (MRC5) su u pozitivnoj korelaciji sa apoptozom
- Ekspresioni profil ispitivanih gena je različit u normalnim i malignim ćelijama pluća u prisustvu ugljeničnih nanocevi, sa naglašenom povećanom ekspresijom gena za apoptozu u malignim ćelijama (A-549) u odnosu na normalne fetalne ćelije plućnih fibroblasta (MRC5).

3. MATERIJAL I METODE

Ogledi u okviru ove disertacije su izvedeni u Laboratoriji za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju Vojvodine, u Laboratoriji za biohemiju i molekularnu biologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu kao i na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u periodu od februara 2013. godine do septembra 2016. godine.

Svi eksperimenti su izvedeni na dve humane ćelijske linije: ćelijama adenokarcinoma pluća i ćelijama fetalnih fibroblasta pluća . Ćelije su tretirane sa jednoslojnim ugljeničnim nanocevima, i kombinacijom ugljeničnih nanocevi i tri različita antioksidanta: N-acetil cisteinom (NAC), resveratrolom (R) i proantocijanidolima (P).

3.1. Materijal

U eksperimentima su korišćene jednoslojne ugljenične nanocevi pod nazivom *Single-Walled Carbon Nanotube*, dobijene metodom lučnog pražnjenja (engl. *electric arc discharge method*) proizvođača Sigma-Aldrich. Jednoslojne ugljenične nanocevi nabavljene su u čvrstom obliku, sa stepenom čistoće 50 - 70%, što je potvrđeno Ramanovom spektroskopijom i skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Dijametar jednoslojnih ugljeničnih nanocevi je prema specifikacijama proizvođača od 1.2-1.5 nm i dužine 2.5 μm . Finalne koncentracije SWCNT u MTT testu bile su 50,100, 250, 500 i 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dok je u kombinacijama sa antioksidantima primenjena koncentracija SWCN od 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Korišćeni su komercijalni preparati **N-acetil cisteina** i **resveratrola**.

N-acetil cistein molekulske mase 163,19, pod nazivom *N-Acetyl-L-cysteine*, nabavljen je od firme Sigma-Aldrich. Osnovni rastvor pripremljen je tako što je 0,0023g NAC-a rastvoreno u 5,09 mL hladnog 0,9% NaCl i neutralisano (pH 7) sa 1N NaOH u odgovarajućem medijumu. Radni rastvori odgovarajuće koncentracije dodavani su u zapremini od 10 μL /kulturi tako da su postignute sledeće finalne koncentracije: 2,77; 5,71; 11,25 i 22,49 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Resveratrol, pod nazivom trans-Resveratrol, čistoće >98% nabavljen je od proizvođača Cayman chemical. Za pripremu osnovnog rastvora koristio se DMSO kao rastvarač. Serija radnih koncentracija pripremljena je razblaživanjem sa medijumom DMEM bez seruma. Rastvor

resveratrola odgovarajuće koncentracije dodavan je u zapremini od 10 μL /kulturi tako da su postignute sledeće finalne koncentracije: 25, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{g/mL}$.

Proantocijanidoli su poklon Vladimira Kovača, profesora Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

Proantocijanidoli su ekstrakt dobijen iz semenki grožđa postupkom koji je zaštićen patentom [62]. Određena količina semenki grožđa, prethodno osušenih na vazduhu, podvrgnuta je ekstrakciji sa etilacetatom i 10% vode tokom 24h uz mućkanje. Odnos semenki i medijuma za ekstrakciju je 1:4. Nakon toga, ekstrakt je odvojen od semenki dekantiranjem, a voda je odstranjena tretiranjem bezvodnim natrijum-sulfatom. Dehidratirani ekstrakt se potom koncentriše pod vakumom na 1/10 zapremine. Mešanjem koncentrovanog ekstrakta sa petostruko većom zapreminom petroletra ili hloroforma, stvara se pahuljičasti talog koji se izdvaja filtriranjem kroz tzv. “nutch” filter B-4 i osuši pod vakumom u desikatoru. Dobijeni prah se zatim liofilizira. Ovaj preparat je smeša dimera (B1, B2, B3 i B4) i trimera (C1) navedenih stereoizomera.

Dobijeni prah je odmeravan u količini potrebnoj da se dobije rastvor koncentracije 160 $\mu\text{g/mL}$ (osnovni rastvor). Za pripremu osnovnog rastvora koristio se 0, 9% NaCl kao rastvarač. Serija radnih koncentracija pripremljena je dvostrukim razblaživanjem sa medijumom DMEM bez seruma. Rastvor proantocijanidola odgovarajuće koncentracije dodavan je u zapremini od 10 μL /kulturi tako da su postignute sledeće finalne koncentracije: 5; 10; 20; 40 i 80 $\mu\text{g/mL}$.

Koncentracija proantocijanidola je izražena masenom ($\mu\text{g/mL}$) a ne molarnom koncentracijom, zbog toga što smeši nije moguće tačno odrediti molekulsku masu.

3.1.1. Ćelijske kulture

Ćelijska linija humanih fetalnih fibroblasta pluća MRC-5 (American Type Culture Collection, CCL171) razvijena je 1966. godine od plućnog tkiva uzetog od fetusa starog 14 nedelja. Prekid trudnoće kod žene stare 27 godina urađen je iz psihijatrijskih razloga.

Ćelijska linija humanog adenokarcinoma pluća A549 (American Type Culture Collection, CCL185) je razvijena 1972. godine kultivisanjem malignih ćelija dobijenih iz uklonjenog tumorskog tkiva belca obolelog od adenokarcinoma pluća starog 58 godina.

Odabirom ove dve ćelijske linije poreklom iz istog organa praćen je odgovor tumorskih, A549 , i zdravih, MRC-5, ćelija na primenu ugljeničnih nanomaterijala, pojedinačno i u kombinaciji sa antioksidantima.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema ćelija

MRC-5 i A549 ćelije su gajene u *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) sa 4,5% glukoze uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma (FTS), (SERVA).

Medijum za gajenje kultura je sadržao antibiotike: penicilin 100 IU/mL i streptomycin 100 µg/mL (ICN Galenika). Ćelijske linije održavane su u sudovima za kulturu (Costar, 25 cm²) na 37 °C, u atmosferi sa 100% vlage i 5% CO₂ (Heraeus).

U eksperimentima su korišćene ćelije u logaritamskoj fazi rasta između trećeg i desetog presađivanja.

A549 i MRC-5 ćelije rastu u jednom sloju, zalepljene za podlogu suda, i neophodno je da se presađuju po postizanju konfluencije od 80% do 90%. Dobijanje jednoćelijske suspenzije je vršeno dodavanjem 0,5% rastvora tripsina, nakon čega su ćelije inkubirane 5 minuta na 37 °C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem medijuma sa serumom, pri čemu se višak tripsina inaktivira u reakciji sa proteinima seruma. Ćelijska suspenzija se zatim centrifugira 10 minuta na 200xg, a ćelijski talog se resuspenduje u svežem medijumu. Nakon toga su određivani broj ćelija i njihova vijabilnost.

U tabeli 3.1. su prikazane korišćene ćelijske linije i uslovi održavanja ćelija u kulturi.

Tabela 3.1. Uslovi održavanja i presađivanja ćelijskih linija

Naziv linije	Održavanje	Presađivanje
ATCC, CCL 185 A594 Humani adenokarcinom pluća	DMEM + 2mM glutamina	2 puta nedeljno; 2-5 x10 ⁴ /mL
ATCC CCL 171 MRC-5 Humani fibroblasti pluća	+ 10% FTS	0.05% tripsin u 0.1% EDTA-PBS

3.2.2. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija

Testovi odbacivanja boje tradicionalno se koriste za određivanje vijabilnosti ćelija, a test odbacivanja boje tripan plavo jedan je od najčešće korišćenih testova [63]. Test se zasniva na sposobnosti neoštećenih ćelija da ostanu nebojene, odnosno ćelije kod kojih je sačuvan integritet membrane ne dozvoljavaju prodor boje u samu ćeliju. Ukoliko se i desi da izvesna količina boje prođe membranu, ćelija izbacuje boju i tako ostaje nebojena. Sa druge strane, oštećene ćelije, kod kojih je narušen integritet ćelijske membrane dozvoljavaju ulazak boje u ćelije pri čemu se one oboje. Posmatranjem ćelija kroz mikroskop u komori za brojanje, jasno se razlikuju neoštećene ćelije koje su bezbojne i oštećene koje pokazuju difuznu ili zrnastu plavu obojenost.

Ćelijska suspenzija zapremine 50 μL se razblaži sa 200 μL rastvora 0,5% boje tripan plavo i ćelije se odmah broje u hemocitometru (Nojbaerova komora) na svetlosnom mikroskopu. Broj ćelija u 1 mL suspenzije izračunat je uzimajući u obzir dimenzije komore i razblaženje prema sledećoj formuli: $N = N_0 \times 10^4 \times 5$ gde je N = ukupan broj živih ćelija u 1 mL suspenzije; N_0 = broj živih ćelija izbrojan po kvadrantu komore hemocitometra; 5 = faktor razblaženja; 10^4 = korekcionni faktor (dubina komore i zapremina u [mL]).

Vijabilnost ćelija je izračunata prema formuli: $V (\%) = (N_0 / (N_0 + M_0)) \times 100$ gde je M_0 = broj mrtvih ćelija izbrojanih po kvadrantu komore hemocitometra.

U svim eksperimentima su korišćene samo žive (vijabilne) ćelije. Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentima je bila veća od 90%.

3.2.3. Tretman ćelija

Ćelije su prvo tretirane pojedinačnim supstancama u pet koncentracija: jednoslojnim ugljeničnim nanocevima i antioksidantima, a zatim i kombinacijama jedne koncentracije ugljeničnih nanocevi sa po pet koncentracija resveratrola, N-acetilcisteina i proantocijanidola u MTT testu. Za ostale testove (određivanje apoptoze, aktivnosti antioksidativnih enzima i ekspresiju gena) koncentracija SWCNT je uvek bila 100 µg/mL, resveratrola 50 µg/mL, a proantocijanidola 10 µg/mL bilo da su dodavani pojedinačno ili u kombinaciji. U tretmanu koji je obuhvatao kombinaciju ugljeničnih nanocevi sa antioksidantima, R, NAC ili P su dodavani 1h pre SWCNT. Ćelije su inkubirane nakon tretmana sledeća 24h, odnosno 48h, nakon čega su izdvajane i pripremane kao jednoćelijska suspenzija za različite testove (MTT i test određivanja vijabilnosti ćelija, apoptoze, aktivnosti antioksidativnih enzima i analizu ekspresije odabranih gena).

Tabela 3.2. Koncentracije ispitivanih supstanci

Supstanca	µg/ mL				
	50	100	250	500	750
SWCNT	50	100	250	500	750
Resveratrol	25	50	75	100	125
N-acetilcistein	1.5	3	6	12	24
Proantocijanidoli	5	10	20	40	80
Napomena: u kombinaciji sa 100 µg/ mL SWCNT, R, NAC i P su dodavani 1h pre SWCNT.					

3.3. Kolorimetrijski MTT test

Citotoksičnost SWCNT, resveratrola, N-acetilcisteina i proantocijanidola je ispitivana kolorimetrijskim testom sa tetrazolijum soli [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid, (MTT)]. Princip testa je redukcija tetrazolijumove soli u plavo obojeni proizvod (formazan), posredstvom mitohondrijalnog enzima sukcinat dehidrogenaze. Dehidrogenaze mitohondrija metabolički aktivnih ćelija redukuju MTT u plavo obojeni produkt formazan. Količina stvorenog formazana je direktno proporcionalna broju živih ćelija u kulturi [64].

Ovim testom je prvo je ispitana citotoksičnost svake pojedinačne supstance, a zatim kombinacija 100 µg/ mL SWCNT sa pet koncentracija resveratrola, NAC ili proantocijanidola.

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, istaložene centrifugiranjem (10 min/200xg) i izbrojane u 0,1% tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u kvadriplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora, tako da je u 100 µL medijuma bilo 5×10^3 ćelija. Ploče sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37°C, sa 5% CO₂ naredna 24 časa. Po isteku inkubacije u sve otvore osim kontrolnih (ćelije u medijumu), dodato je po 10 µL ispitivane supstance odgovarajuće koncentracije. Svaka supstanca je ispitivana u 5 koncentracija i inkubacija je nastavljena pod istim uslovima u toku 24 ili 48 h. Rastvor MTT, pripremljen neposredno pre dodavanja, dodat je u sve otvore na ploči u zapremini od 10 µL/otvoru i inkubacija je nastavljena naredna 3h (u termostatu na 37°C, sa 5% CO₂). Po isteku inkubacije u svaki otvor je dodato po 100 µL 0.04 mol/L HCl u izopropanolu da bi se rastvorio stvoreni formazan. Apsorbancija je očitavana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan Accent, MCC/340Thermo Labsystems) na test talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm. Otvori na ploči koji su sadržavali samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba ("blank").

Citotoksičnost (CI) u nizu primenjenih koncentracija izražena je u procentima, prema sledećoj formuli: $CI [\%] = (1 - A_s / A_k) \times 100$

pri čemu je A_k apsorbancija kontrolnih uzoraka, a A_s apsorbancija uzoraka sa ispitivanom supstancom.

3.3.1. Kontrola kvaliteta MTT testa

Vijabilnost posađenih ćelija je bila veća od 90%, što je određeno testom sa tripan plavim. Ćelije su korišćene u logaritamskoj fazi rasta i u količini koja je obezbeđivala logaritamski rast ćelija tokom trajanja testa (za obe ćelijske linije je bilo 5×10^3 /otvoru). Apsorbanca (A) kontrolnih uzoraka (netretirane ćelije u medijumu) bila je najmanje tri puta veća od srednje vrednosti A za slepu probu (samo medijum). Srednja vrednost, standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije (CV) izračunati su za replikate uzoraka (najmanje za triplikat) u svakom ponavljanju pomoću kompjuterskog programa *Microsoft Office Excel*. Koeficijent varijacije eksperimentalnih i kontrolnih uzoraka bio je manji od 10%.

Antiproliferativna aktivnost je izražena kao IC_{50} vrednost za svako pojedinačno ispitivano jedinjenje, na svakoj od ispitivanih ćelijskih linija i za svaki određeni period izlaganja. Ova vrednost je definisana kao doza jedinjenja (koncentracija za određeno vreme tretmana) koja inhibira rast ćelija u kulturi za 50% u odnosu na netretirane ćelije kontrolne grupe. IC_{50} vrednost je određena „*Median effect*” analizom pomoću programa *Microsoft Office Excel* [65].

3.4. Transmisiona elektronska mikroskopija

Transmisionom elektronskom mikroskopijom ispitivana je unutarćelijska lokalizacija ugljeničnih nanocevi u odnosu na ispitivane ćelije. MRC-5 i A549 ćelije tretirane sa 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT i kombinacijom 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT sa 50 $\mu\text{g/mL}$ resveratrola tokom 24h. Netretirane MRC-5 odnosno A549 ćelije korišćene su kao kontrola. Nakon ispiranja u PBS-u MRC-5 i A549 ćelije su fiksirane u 3% glutaraldehidu u kakodilatnom puferu (Sigma). Ćelijski talog je post fiksiran u 1% osmijum tetroksidu, dehidriran u rastućim koncentracijama etil alkohola i ukalupljen u EPOXY smolama (Epon 812, Sigma). Ultratanki isecci isečeni na ultramikrotomu (Leica) su kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom i analizirani transmisionim elektronskim mikroskopom (Morgagni 268D).

3.5. Ispitivanje modulacije ćelijskog ciklusa

Distribucija ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa (subG1, G0/G1, S i G2/M) analizirana je merenjem sadržaja ćelijske DNK u MRC-5 i A549 ćelijama fiksiranih etanolom i obojenih propidijum jodidom, pomoću BD imunocitometrijskog sistema. Izračunat je procenat ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa. Frakcija ćelija u subG1 fazi je posmatrana kao populacija apoptotičnih ćelija.

3.6. Određivanje apoptoze

Za ranu fazu apoptoze karakteristične su promene na površini ćelije, tj. promene na nivou membrane. Jedna od membranskih promena je translokacija fosfatidil-serina (PS) sa unutrašnje na spoljašnju površinu plazma membrane. Annexin V je 35-36 KD Ca^{2+} zavisan fosfolipid vezujući protein sa visokim afinitetom za PS. S obzirom da i kod nekrotičnih ćelija PS izlazi na spoljašnju stranu membrane, istovremeno bojenje ćelija Annexinom V konjugovanim sa fluorescein izotiocijanatom (FITC) i propidijum-jodidom omogućava razlikovanje apoptotskih od nekrotičnih ćelija.

Prisustvo ćelija u apoptozi koje su tretirane ispitivanim supstancama je određivano pomoću komercijalnog kita za detekciju apoptoze - Annexin-V-FLUOS (BD Pharmingen™, BD Biosciences).

Milion ćelija/mL (MRC-5; A549) je tretirano tokom 24 h ispitivanim supstancama, pojedinačno ili u kombinaciji, pri čemu su korišćene sledeće koncentracije: SWCNT 100 $\mu\text{g/mL}$, resveratrol 50 $\mu\text{g/mL}$ i proantocijanidoli 10 $\mu\text{g/mL}$. Kontrolni uzorak su činile netretirane ćelije. Nakon označenog vremena, ćelije su isprane dva puta hladnim PBS-om i resuspendovane u 1000 μL PV (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2). 100 μL ćelijske suspenzije (1×10^5 ćelija) je prebačeno u epruvete i dodato je 5 μL Annexin V-FITC i 5 μL propidijum-jodida. Ćelije su blago promućkane i inkubirane sa datim fluorescentnim bojama 15 minuta na 25 °C, u mraku. Nakon toga, 400 μL pufera za vezivanje je dodato u svaku epruvetu i analizirano na BD FACS Calibur protočnom citometru primenom Cell Quest kompjuterskog programa.

Procenat specifične apoptoze je određivan prema formuli:

$$\% \text{ specifične apoptoze} = \frac{100 \times (\text{eksperimentalna apoptoza (\%)} - \text{spontana apoptoza (\%)})}{100\% - \text{spontana apoptoza (\%)}}$$

Procenat specifične nekroze je određivan prema formuli:

$$\% \text{ specifične nekroze} = \frac{100 \times (\text{eksperimentalna nekroza (\%)} - \text{spontana nekroza (\%)})}{100\% - \text{spontana nekroza (\%)}}$$

3.7. Analiza ekspresije gena

Jedan od ciljeva ovog istraživanja je bilo ispitivanje efekata SWCNT, resveratrola, proantocijanidola kao i kombinacije SWCNT sa pomenutim antioksidantima na profil genske ekspresije u MRC-5 i A549 ćelijama. Praćena je ekspresija odabranih gena čiji su produkti uključeni u proces apoptoze (Bak, Bax, Bcl2), regulaciju ćelijske proliferacije (AKT, MAPK1, NFkB), antioksidativnu zaštitu (GST, GPx, GR, SOD, CAT) i sintezu glutationa (GSS, GCL). Kvantifikacija genske ekspresije rađena je primenom metode kvantitativne analize lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (*Relative Quantitative polymerase chain reaction, RQ-PCR*). S ciljem primene ove metode, iz MRC-5 i A549 ćelija je izolovana ukupna RNK koja je prevedena u komplementarnu DNK koja je zatim korišćena u RQ-PCR analizi.

3.7.1. Izolacija ukupne RNK iz ćelija

Ukupna RNK iz MRC-5 i A549 ćelija (3-5 miliona ćelija) tretiranih sa jednoslojnim ugljeničnim nanocevima (100 µg/mL), resveratrolom (50 µg/mL) i proantocijanidolima (10 µg/mL) pojedinačno i u kombinaciji, je izolovana pomoću komercijalnog kompleta *GenElute Mammalian total RNA mini prep kit* (Sigma-Aldrich, Nemačka). Uzorci ćelija su lizirani i homogenizovani u 250 µL rastvora za liziranje koji je sadržao guanidin tiocijanat i 2-merkaptoetanol kako bi se oslobodila RNK i inaktivirale ribonukleaze (RNaze). Lizat je zatim filtriran da bi se uklonili ćelijski ostaci i fragmentisana DNK. Filtrat koji sadrži RNA je zatim

razblažen sa 250 μL 70% etanola i nanet na novu kolonu od modifikovanog silika gela za koju se vezuje RNA. Nakon toga, RNK je isprana i eluirana sa kolone u 50 μL rastvora za eluciju.

3.7.2. Procena čistoće i kvaliteta uzoraka RNA

Koncentracija i čistoća rastvora RNK su određene spektrofotometrijski na BioSpec-nano spektrofotometru (Shimadzu), merenjem apsorbanca uzoraka na talasnim dužinama od 260, 280 i 230 nm. Integritet ukupne RNK je potvrđen agaroznom elektroforezom na 1% (w/v) agaroznom gelu. Nakon određivanja koncentracije i procene čistoće ukupne RNK, koncentracija svih uzoraka je izjednačena na 250 ng/ μL dodavanjem sterilne dietilpirokarbonat (DEPC) tretirane vode, a potom su uzorci zamrznuti na -80°C .

3.7.3. Sinteza komplementarne DNA

Komplementarna DNK (*complementary DNA*, *cDNA*) je sintetisana korišćenjem kompleta *Enhanced Avian Reverse Transcriptase* (Sigma-Aldrich), koristeći 1,5 μg ukupne RNA svakog uzorka kao matricu. Pripremljena smeša RNA matrice (1,5 μg), deoksiribonukleotida (dNTPs) (500 μM svaki) i prajmera (2,5 μM nasumični nanomeri i 3,5 μM oligo-dT) u ukupnoj zapremini od 10 μL je inkubirana 10 min na 70°C kako bi se narušila sekundarna struktura RNK i povećala efikasnost reverzne transkripcije. Zatim su u reakcionu smešu dodati reverzna transkriptaza virusa ptičje mijeloblastoze (*Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase AMV-RT*) (1 U/ μL), odgovarajući pufer (1X koncentrovan) i inhibitor RNaza (1U/ μL) do ukupne zapremine od 20 μL . Reakcione tubice su inkubirane 15 min na 25°C , a potom 50 min na 50°C nakon čega je cDNK razblažena do koncentracije 25 ng/ μL .

3.7.4. Relativna kvantifikacija genske ekspresije – RQ-PCR

Relativna kvantifikacija ekspresije gena rađena je na uređaju *Eppendorf Realplex mastercycler* (Eppendorf), koristeći *2X SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) za detekciju amplikona. Reakciona smeša ukupne zapremine 14 μl je sadržala 7 μl *2X SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 600 nM svakog prajmera i 75 ng cDNA. Program amplifikacije se sastojao od koraka početne denaturacije na 95°C (10 min) i 40 ciklusa koji su se sastojali od dva koraka: 15 s na 95°C i 1 min na 60°C . Kriva topljenja svake reakcije je snimana

u temperaturnom opsegu od 65°C do 95°C, sa promenom temperature od 0,5°C/5 s radi provere specifičnosti PCR reakcije.

Za analizu su korišćeni oligonukleotidni graničnici (prajmeri) za gene za AKT, MAPK1, NFkB, GSS, GR, GCL, GST, GST-Px, SOD, CAT, Bak, Bax, Bcl2 gene dizajnirani koristeći *Primer Express 3.0* Softver (Applied Biosystems, SAD) upotrebom metode preskakanja introna (*intron spanning*) da bi se sprečilo umnožavanje eventualnih kontaminanata poreklom od genomske DNA. Za referentni gen, koji je konstitutivno eksprimiran u svim eksperimentalnim grupama i na osnovu kog se izračunava relativna ekspresija ciljnih gena izabran je gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH). Sekvence uzvodnog F-prajmera (*forward*) i nizvodnog R-prajmera (*reverse*) za referentni gen i za ciljne gene su prikazane u Tabeli 3.3.

Relativni nivo ekspresije iRNK za analizirane gene je određen pomoću Ct vrednosti (*threshold cycle values*) a normalizovan je sa referentnim genom kako bi se dobio broj kopija. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti triplikata RQ-PCR merenja i standardna devijacija (SD) srednje vrednosti. Statistički značajne razlike su određene jednodimenzionalnom analizom varijanse (ANOVA) sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Tabela 3.3. Lista prajmera za RQ-PCR ekspresionu analizu

Redni broj	Naziv prajmera	Sekvenca (5' → 3')	Naziv gena i njegov identifikacioni broj
1	GAPDH_F	AGCCTCAAGATCATCAGCAAT	Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA (NM_001289746.1)
	GAPDH_R	GGACTGTGGTCATGAGTCCTT	
2	AKT1_F	AAGTCAAAGGGGCTGCCTGG	Homo sapiens AKT serine/threonine kinase 1 (AKT1), mRNA (XM_017021078.1)
	AKT1_R	ACTCCCCTCGTTTGTGCAGC	
3	GSS_F	AACCGTTCGCGGAGGAAAGG	Homo sapiens glutathione synthetase (GSS), mRNA (NM_000178.3)
	GSS_R	ACCAGTGAGGGGAAGAGCGT	

4	BCL2_F	AAGCTGTCACAGAGGGGCTA	Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2), mRNA (XM_017025917.1)
	BCL2_R	CTCTCAGGCTGGAAGGAGAA	
5	NFkB_F	CACAAGGAGACATGAAACAGC	Homo sapiens nuclear factor kappa B subunit 1 (NFkB1), mRNA (XM_011532008.2)
	NFkB_R	CCAGAGACCTCATAGTTGTCCA	
6	GR_F	TCTCCCAGGTCAAGGAGGT	Homo sapiens glutathione-disulfide reductase (GSR), mRNA (NM_000637.3)
	GR_R	ATCGGTTTGAATCCCCAGTT	
7	SOD_F	CGTCACCGAGGAGAAGTACC	Homo sapiens superoxide dismutase 2 (SOD2), mRNA (NM_001322820.1)
	SOD_R	CTGATTTGGACAAGCAGCAA	
8	GST_F	GAGAGAGCCCTGATTGATATGTA	Homo sapiens glutathione S-transferase alpha 1 (GSTA1), mRNA (XM_005249034.3)
	GST_R	GCCAACAAGGTAGTCTTGTCC	
9	GPx_F	TTCCCGTGCAACCAGTTTG	Homo sapiens glutathione peroxidase (GPx1), mRNA (NM_000581.3)
	GPx_R	TTCACCTCGCACTTCTCGAA	
10	BAK_F	GAACAGGAGGCTGAAGGGGT	Homo sapiens BCL2 antagonist/killer 1 (BAK), mRNA (XM_011514779.2)
	BAK_R	TCAGGCCATGCTGGTAGACG	
11	BAX_F	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	Homo sapiens BCL2 associated X protein (BAX), mRNA (XM_017027077.1)
	BAX_R	GCAATCATCCTCTGCAGCTC	
12	CAT_F	TCCACTGTTGCTGGAGAATC	Homo sapiens catalase (CAT), mRNA (NM_001752.3)
	CAT_R	ATGTCCGGATCCTTCAGATG	
13	MAPK1_F	TGACCCCTGGTCCTGTCTCC	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), mRNA NM_002745.4
	MAPK1_R	TACTGCCGCAGGTCACCAATG	
14	GCL_F	ATGCGAAAACGCCGGAAGGA	Homo sapiens glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), (mRNA NM_001498.3)
	GCL_R	ACTGAAGCGAGGGTGCTTGT	

Tabela 3.3. Lista prajmera za RQ-PCR ekspresionu analizu

3.8. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Metoda za određivanje ukupnih proteina po Bradford-u se zasniva na formiranju kompleksa između boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* i proteina. Pri vezivanju za protein boja prelazi u stabilnu neprotonovanu formu, sa maksimumom apsorpcije na 595 nm [66].

Bradford-ov reagens sadrži 10 mg CBB, 5 mL 96% etanola, 10 mL 85% fosforne kiseline i destilovane vode do 100 mL.

Albumin goveđeg seruma (BSA) koristi se za formiranje standardne krive: osnovni rastvor sadrži 2 mg BSA/mL, a radni rastvori: 0.125; 0.25; 0.5; 0.75; 1.0; 1.5 mg BSA/mL.

Standardni protokol je prilagođen eseju u mikrotitar pločici, reakcione zapremine od 250 μ L. U bunarčić mikrotitar pločice dodaje se 5 μ L rastvora proteina, odnosno uzorka (za slepu probu radnog pufera) i 250 μ L reagensa. Inkubacija se odvija 5 minuta (najduže 1 sat) na sobnoj temperaturi. ApSORBANCA se očitava na fotometru na 595 nm. Koncentracija proteina u uzorku određuje se na osnovu standardne krive. Ukoliko je uzorak bio razblažen, očitana koncentracija sa standardne prave množi se sa faktorom razblaženja.

3.9. Merenje aktivnosti antioksidativnih enzima (AOS)

Uzorci ćelija za određivanje aktivnosti AOS pripremljeni su nakon tretiranja MRC-5 ili A549 ćelija (24h) jednoslojnim ugljeničnim nanocevima (100 μ g/mL), resveratrolom (50 μ g/mL) i proantocijanidolima (10 μ g/mL) pojedinačno i u kombinaciji navedenih koncentracija.

Ispitivanje aktivnosti antioksidativnih enzima je izvršeno iz citosolne frakcije koja se dobija dodatkom 2,5 μ g digitonina (Sigma-Aldrich, Nemačka) na 1×10^6 ćelija upotrebom 1% w/v rastvora digitonina u DMSO (1 mg/100mL). Nakon toga ćelije su centrifugirane 10 minuta na 4000 rpm i dobijeni supernatant je čuvan na -20°C , do enzimskih analiza.

3.9.1. Određivanje specifične aktivnosti katalaze (CAT)

Katalaza (EC 1.11.1.6) katalizuje reakciju razgradnje vodonik peroksida do kiseonika i molekula vode. Aktivnost katalaze određivana je metodom po Aebi [67]. Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju razgradnje H₂O₂ na 240 nm. Aktivnost CAT se prati kao pad apsorbance na datoj talasnoj dužini.

Reagensi:

0.05 M fosfatni pufer pH 7.0

30 % rastvor H₂O₂

Rastvor H₂O₂ u fosfatnom puferu se podesi tako da vrednost apsorbance dobijenog rastvora na 240 nm bude između 0.520-0.550.

Postupak: Dodavanjem 5-10 µL uzorka u podešeni rastvor H₂O₂ u fosfatnom puferu (finalna zapremina od 3 mL) odpočinje reakcija. Reakcija se prati u toku tri minuta spektrofotometrijski, kao pad apsorbance na 240 nm.

Izračunavanje: aktivnost CAT se izražava u jedinicama aktivnosti na mg proteina

$$\text{specifična aktivnost CAT} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times 1000}{43.6 \times C_{pr} \times V_{uz}/V_{rs}}$$

ΔA_{uz} - promena apsorbance u minuti za uzorak

ΔA_{sp} - promena apsorbance u minuti za slepu probu

C_{pr} - koncentracija proteina mg/mL

V_{uz} - zapremina uzorka

V_{rs} - zapremina reakcione smeše

43.6 - molarni ekstincioni koeficijent za vodonik peroksid na 240 nm

3.9.2. Određivanje specifične aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Superoksid dismutaza (EC 1.15.1.1) katalizuje reakciju dismutacije superoksid radikala. Aktivnost SOD je određivana po metodi McCord i Fridovich u sistemu citohrom C (Fe^{3+})/ksantin/ksantin oksidaza [68]. Metoda se zasniva na tome da superoksid radikal, koji se generiše u reakciji ksantina sa ksantin oksidazom, redukuje citohrom C (Fe^{3+} do Fe^{2+}) što je praćeno promenom apsorbance na 550 nm. Superoksid dismutaza će dismutirati superoksid radikal tako da će se smanjiti brzina redukcije citohroma C. Ovo smanjenje je proporcionalno aktivnosti SOD. Kao jedinica aktivnosti superoksid dismutaze definisana je ona aktivnost SOD potrebna za smanjenje brzine redukcije za 50 % (pri promeni apsorbance od 0.025/min).

Reagensi:

0.5 M KH_2PO_4

0,5 M Na_2HPO_4

100 mM EDTA

100 mM NaN_3

50 μM ksantin

Ksantin oksidaza (XOD, iz kravljeg mleka, Sigma)

20 μM citohrom C (Fe^{3+}) (iz konjskog srca, tip III, Sigma)

Rastvor A sadrži: 0.57 mL KH_2PO_4 , 3.14 mL Na_2HPO_4 , 0.1 mL EDTA, 1.0 mL NaN_3 , 1.0 mL ksantina, 0.4 mL citohroma C, i dH_2O pH 7.8 do 100 mL. Rastvor je stabilan tri dana na $+4^\circ\text{C}$. Tokom rada drži se na sobnoj temperaturi.

Rastvor B sadrži: 0.2 U XOD/mL u 0.1 mM EDTA. Rastvor se drži na ledu, a pravi se svež svakog dana.

Reakcion smeša sadrži rastvora A i B, uzorak i vodu u sledećem odnosu: 1.3 mL rastvora A, 25-100 μL uzorka, 0.1 mL rastvora B, ako je potrebno dopuniti vodom do 1,5 mL. Reakcija odpočinje dodavanjem rastvora B, a apsorbance se prati u toku tri minuta. Promena apsorbance slepe probe treba da iznosi 0.025/minuti. Reakcija se odigrava na sobnoj temperaturi.

Izračunavanje: aktivnost SOD se izražava u jedinicama aktivnosti po mg proteina.

$$\text{specifična aktivnost SOD} \left(\frac{U}{\text{mg prot}} \right) = \frac{(\Delta\text{Asp} - \Delta\text{Auz}) \times 100}{50 \times \Delta\text{Asp} \times \text{Cpr} \times \text{Vuz}}$$

ΔAsp – srednja promena apsorbance slepe probe

ΔAuz – srednja promena apsorbance uzorka u minuti

ΔCpr – koncentracija proteina u uzorku (mg/mL)

Vuz - zapremin uzorka u mL

3.9.3. Određivanje specifične aktivnosti glutation S-transferaze (GST)

Glutation S-transferaza (EC 2.5.1.18.) katališe reakciju konjugacije elektrofilnih jedinjenja sa redukovanim glutationom. Aktivnost GST je određena sa 1-hloro-2,4-dinitrobenzenom kao supstratom (CDNB) [69]. Metoda se zasniva na formiranju kompleksa CDNB sa glutationom, a reakciju katališe glutation S-transferaza. Brzina formiranja kompleksa se prati spektrofotometrijski na 340 nm.

Reagensi:

0.1 M fosfatni pufer pH 6.5

30.4 mg CDNB rastvoren u 5 ml etanola (96%)

10 mM GSH u 0,1M fosfatnom puferu pH 6,5

Reakciona smeša sadrži: 0.55 mL pufera, 25 μL CDNB, 75 μL GSH i do 50 μL uzorka.

Reakcija započinje dodatkom uzorka (obično 2-10 μL , ostatak dH_2O). Slepa proba sadrži sve komponente osim uzorka. Promena apsorbance se prati tri minuta na 340 nm, pri temperaturi od 25 $^{\circ}\text{C}$.

Izračunavanje: Aktivnost GST se izračunava pomoću molarnog ekstinkcionog koeficijenta za CDNB (iznosi 9.6) i izražava se na mg proteina. Jedna specifična jedinica aktivnosti GST je definisana kao količina enzima potrebna za konjugaciju 1 μmol CDNB sa redukovanim glutationom po minuti pri pH 6.5 i 25 $^{\circ}\text{C}$.

$$\text{specifična aktivnost (GST)} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{asp}}) \times V_{\text{rs}} \times 1000}{9.6 \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{uz}}}$$

ΔA_{uz} - promena apsorbance u minuti za uzorak

ΔA_{asp} - promena apsorbance u minuti za slepu probu

C_{pr} - koncentracija proteina [mg/mL]

V_{uz} - zapremina uzorka [mL]

V_{rs} - zapremina reakcione smeše [mL]

3.9.4. Određivanje specifične aktivnosti glutacion reduktaze (GR)

Glutacion reduktaza (E.C. 1.6.4.2.) katalizuje reakciju redukcije glutacion disulfida (GSSG) do glutationa (GSH) uz NADPH kao redukujući kofaktor. Metoda se zasniva na praćenju oksidacije NADPH na 340 nm, u reakciji u kojoj enzim katalizuje redukciju oksidovanog u redukovani glutation [70].

Reagensi:

0.5M fosfatni pufer pH7.4

2mM GSSG 0.1mM NADPH

U spektrofotometrijsku kivetu doda se 0.2 mL fosfatnog pufera, 0.3 mL GSSG, 0.3 mL uzorka i vode do 1 mL. Reakcija otpočinje dodatkom 0.03 mL NADPH. Optimalna temperatura reakcije je 37°C. Prati se promena apsorbance u toku 3 minuta.

Izračunavanje: aktivnost GR se izražava u specifičnim jedinicama aktivnosti na mg proteina. Jedna specifična jedinica aktivnosti GR je definisana kao količina enzima neophodna da katalizuje redukciju jednog μmol -a GSSG po minuti pri pH 7.5 i 25°C. Kako se za redukciju jednog molekula GSSG troši jedan molekul NADPH, merenje oksidacije NADPH direktno korelira sa redukcijom GSSG.

$$\text{spec aktivnost GR} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times V_{\text{rs}} \times 1000}{6.22 \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{pr}}}$$

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti

ΔA_{sp} – srednja promena apsorbance slepe probe

C_{pr} – koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]

V_{rs} – zapremina reakcione smeše [mL]

V_{uz} – zapremina uzorka [mL]

3.9.5. Određivanje specifične aktivnosti glutation peroksidaze (GPx)

Glutation peroksidaza (E.C. 1.11.1.9.) katališe redukciju organskog peroksida uz nastajanje oksidovanog glutationa. GSSG se ponovo redukuje do GSH uz NADPH (kao donora redukcionih ekvivalenata), a reakciju katališe enzim glutation reduktaza. Aktivnost GPx se prati spektrofotometrijski, indirektno, praćenjem pada apsorbance na 340 nm koja potiče od NADPH [71].

Reagensi:

1 mM redukovanog glutationa (0.001M)

0.2 mM NADPH u 1% NaHCO₃

1 mM NaN₃

1 mM EDTA

0,5 M fosfatnogpufera, pH7.0

0.03 M t-butilhidroperoksida (0.03 M)

glutation reduktaza (GR), 105 IU/mg proteina

U spektrofotometrijsku epruvetu se dodaje 0,1 mL rastvora redukovano glutationa, 0,2 mL rastvora NADPH, 0,033 mL NaN₃, 0,033 mL EDTA, 0,1 mL fosfatnog pufera, 0,033 mL t-butilhidroperoksida i 50 µL uzorka. Smeša se inkubira tokom 10 min na 37 °C tokom 10 min nakon čega reakcija počinje dodavanjem 1,7 µL GR. Apsorbanca se očitava na 340 nm u toku 3 min. U slepu probu se umesto GR dodaje 1,7 µL destilovane vode.

Izračunavanje: Specifična aktivnost GPx se izražava kao broj nmol NADPH oksidovanih po minuti po mg proteina.

$$\text{spec aktivnost GPx} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times V_{\text{rs}} \times 1000}{6.22 \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{pr}}}$$

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti

ΔA_{sp} – srednja promena apsorbance slepe probe

C_{pr} – koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]

V_{rs} – zapremina reakcione smeše [mL]

V_{uz} – zapremina uzorka [mL]

3.9.6. Određivanje koncentracije redukovano glutationa

Redukovani glutation je određivan metodom po Ellman koja se zasniva na reakciji redukovano glutationa i 5,5' - ditiobis(2-nitrobenzoičnom kiselinom, DTNB) pri čemu nastaje oksidovani glutation GSSG i 2-nitro5-tiobenzoična kiselina (TNB) [72]. Nastala TNB se spektrofotometrijski određuje merenjem apsorbance na 405nm.

Reagensi:

Ellmanov reagens: 0,2 mM DTNB u 0,1 M fosfatnom puferu pH 8,0 (0,004 g DTNB u 50 mL pufera)

4% sulfosalicilna kiselina (SSA)

Standardi GSH koncentracije od 2 do 0,125mM su pripremani po šemi datoj u Tabeli 3.4.

Tabela 3.4. Priprema standardnih rastvora za određivanje redukovanog glutaciona

Tubica br.	Zapremina standarda (uL)	Izvor standarda	Zapremina pufera (uL)	Finalna konc (mM)
1	10	20 mM štok*	90	2
2	7,5	20 mM štok*	92,5	1,5
3	5	20 mM štok*	95	1,0
4	50	Tubica 2	50	0,75
5	50	Tubica 3	50	0,5
6	50	Tubica 5	50	0,25
7	50	Tubica 6	50	0,125
8 (blank)	-	-	100	0

* Koncentrovani (štok) rastvor 20 mM (0,0031 g GSH (MW= 307,33 g/mol) u 500 uL 4% SSA)

Priprema uzorka: 0,2 mL suspenzije ćelija je precipitirano sa 1mL hladne 4% SSA i homogenizovano ručnim homogenizerom u Eppendorf tubici. Homogenat je dalje centrifugiran 2,5 min na 10000g. Dobijeni supernatant je korišćen za određivanje redukovanog glutaciona.

Postupak: 20 μ L uzorka ili standarda dodati u 200 μ L Elmanovog reagensa, sačekati do 5 min da se razvije žuta boja. Apsorbanca se meri na 405 nm. Koncentracija GSH u uzorku je određena iz standardne prave, a izražena kao nmol na 10^6 ćelija.

3.10. Statistička obrada podataka

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni pomoću programa Statistica for Windows Release 5.0. Srednja vrednost, standardna devijacija i koeficijent varijacije izračunati su za replikate (najmanje triplikati) uzoraka u svakom eksperimentu. Dva nezavisna eksperimenta sa MTT testom urađena su u kvadriplikatu za svaku koncentraciju ispitivane supstance. Svaki eksperiment je urađen dva ili tri puta. Koeficijent varijacije (CV) u eksperimentalnim i kontrolnim kulturama bio je manji od 10%.

Citotoksičnost je izražena procentom. Koncentracija kojom se postiže 50% inhibicije rasta odnosno citotoksičnosti (IC_{50}), određena je "Median effect" analizom pomoću programa Calcu Syn.

Procenat apoptoze i analiza ćelijskog ciklusa određeni su primenom Cell Quest kompjuterskog programa.

Razlike između srednjih vrednosti i određivanje stepena značajnosti je urađeno analizom varijanse (ANOVA) sa Tukey post-hoc testom. Kao granica statističke značajnosti je uzeta vrednost $p < 0,05$.

Za grafičke prikaze je korišćen Microsoft Office Excel 2010.

4. REZULTATI

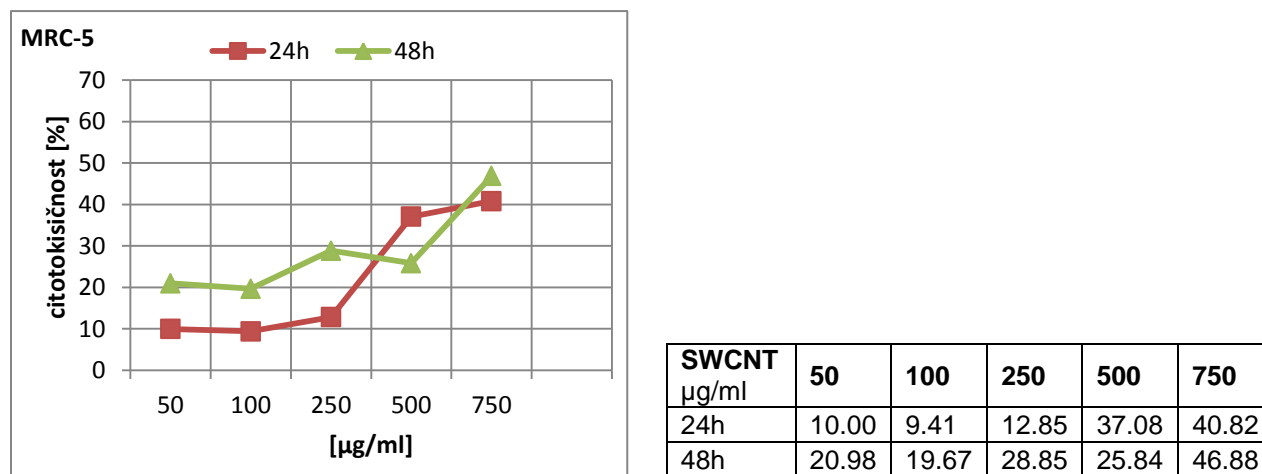
4.1. Rezultati ispitivanja ćelijske proliferacije primenom MTT testa

U cilju određivanja antiproliferativnog efekta SWCNT, resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola pojedinačno, kao i kombinacija SWCNT sa navedenim antioksidantima, MRC-5 i A549 ćelije tretirane su tokom dva eksperimentalna vremena (24h i 48h) sa svakom ispitivanom supstancom u rasponu od pet rastućih koncentracija. Kombinacija SWCNT i antioksidanata podrazumevala je tretman fiksnom koncentracijom SWCNT sa po pet rastućih koncentracija svakog antioksidanta. Citotoksično dejstvo na ćelije mereno je tetrazolijum kolorimetrijskim testom (MTT test), neposredno po završetku inkubacije sa ispitivanim supstancama.

4.1.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti SWCNT prema MRC-5 ćelijskoj liniji

Na osnovu rezultata dobijenih tretiranjem MRC-5 ćelijske linije SWCNT u rasponu koncentracija od 50 do 750 $\mu\text{g/mL}$ u toku 24 i 48h može se zaključiti da SWCNT u oba ispitivana vremena inhibiraju rast MRC-5 ćelija. Tretmanom sa 50, 100 odnosno 250 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT tokom 24h dobija se približno isti antiproliferativni efekat (10-13%). U inkubacionom periodu koji je trajao 48 h ujednačen antiproliferativni efekat primećen je nakon tretmana sa 50 i 100 $\mu\text{g/mL}$ (oko 20%), odnosno 250 i 500 $\mu\text{g/mL}$ gde je stepen inhibicije bio 28,85 odnosno 25,84%. Najznačajniji antiproliferativni efekat za oba ispitivana vremena utvrđen je nakon ćelijskog tretmana sa 750 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT.

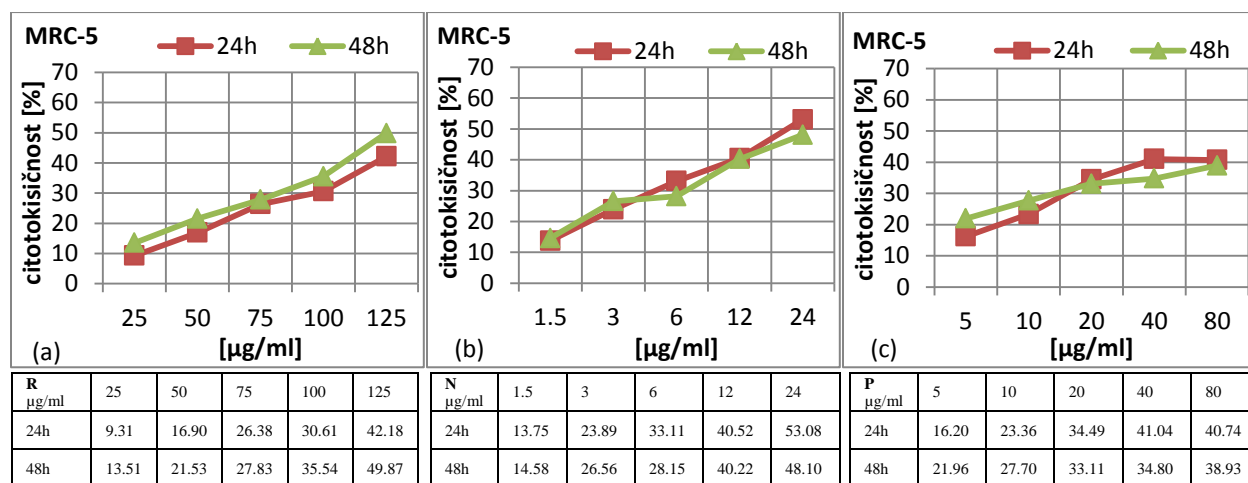
Na grafikonu 4.1. prikazano je delovanje SWCNT na proliferaciju MRC-5 ćelija, primenom MTT testa.



Grafikon 4.1. Uticaj SWCNT na proliferaciju MRC-5 ćelija nakon inkubacije u toku 24h i 48h

4.1.2. Ispitivanje citotoksične aktivnosti resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola prema MRC-5 ćelijskoj liniji

Citotoksična aktivnost ispitivanih antioksidanata prema ćelijskoj liniji MRC-5 prikazana je na grafikonu 4.2. U opsegu ispitivanih koncentracija navedenih antioksidanata, utvrđena je koncentracijski zavisna citotoksična aktivnost nakon perioda inkubacije od 24, odnosno 48h. Pri tretmanu istim koncentracijama ispitivanih antioksidanata, antiproliferativni efekat je bio sličan za oba inkubaciona perioda.

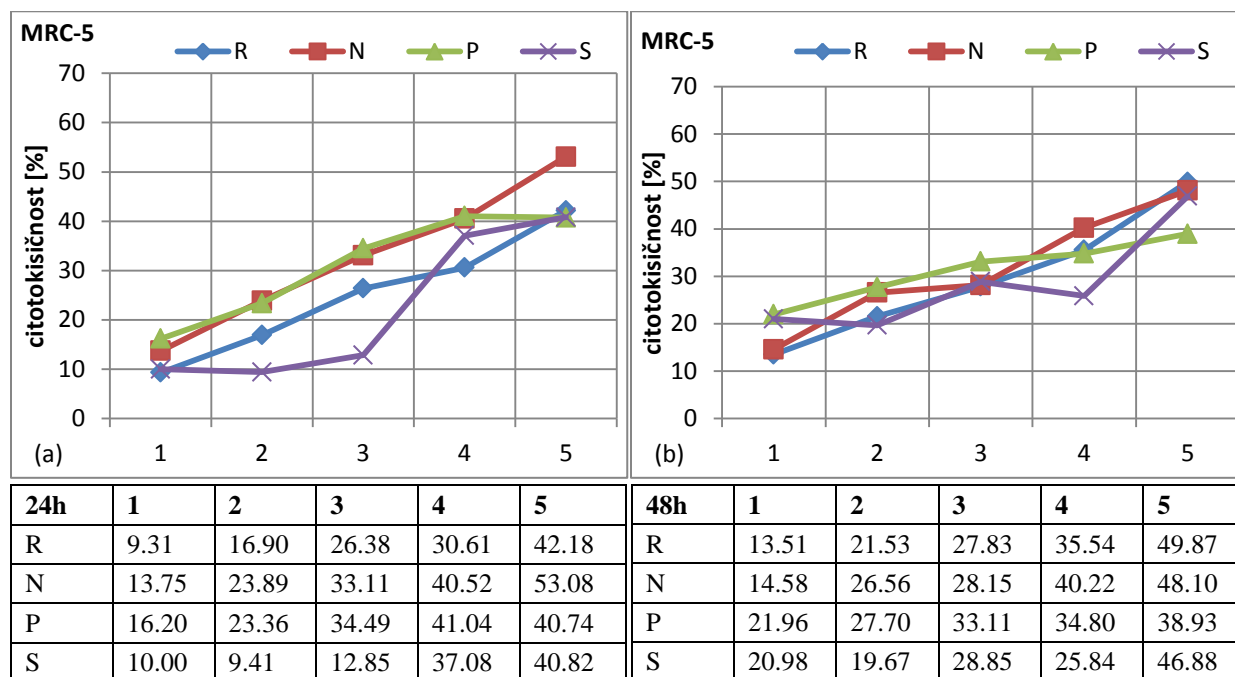


Grafikon 4.2. Uticaj različitih koncentracija (a) resveratrola, (b) N-acetil cisteina i (c) proantocijanidola na proliferaciju MRC-5 ćelija nakon inkubacije u toku 24h i 48h.

4.1.3. Ispitivanje citotoksične aktivnosti SWCNT, resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola prema MRC-5 ćelijskoj liniji

Tretiranjem MRC-5 ćelijske linije SWCNT, resveratrolom, N-acetil cisteinom i proantocijanidolima tokom 24 i 48 h može se zaključiti da sve četiri supstance inhibiraju rast MRC-5 ćelija, a stepen inhibicije zavisi od koncentracije ispitivanih supstanci. Niske koncentracije navedenih supstanci imaju blag antiproliferativni efekat tokom oba perioda inkubacije, što je pogotovo uočljivo u tretmanu sa SWCNT, dok se pri visokim koncentracijama svake ispitivane supstance postiže sličan inhibični efekat na rast ćelija.

Na grafikonu 4.3. prikazano je delovanje SWCNT, resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola na proliferaciju MRC-5 ćelija, primenom MTT testa

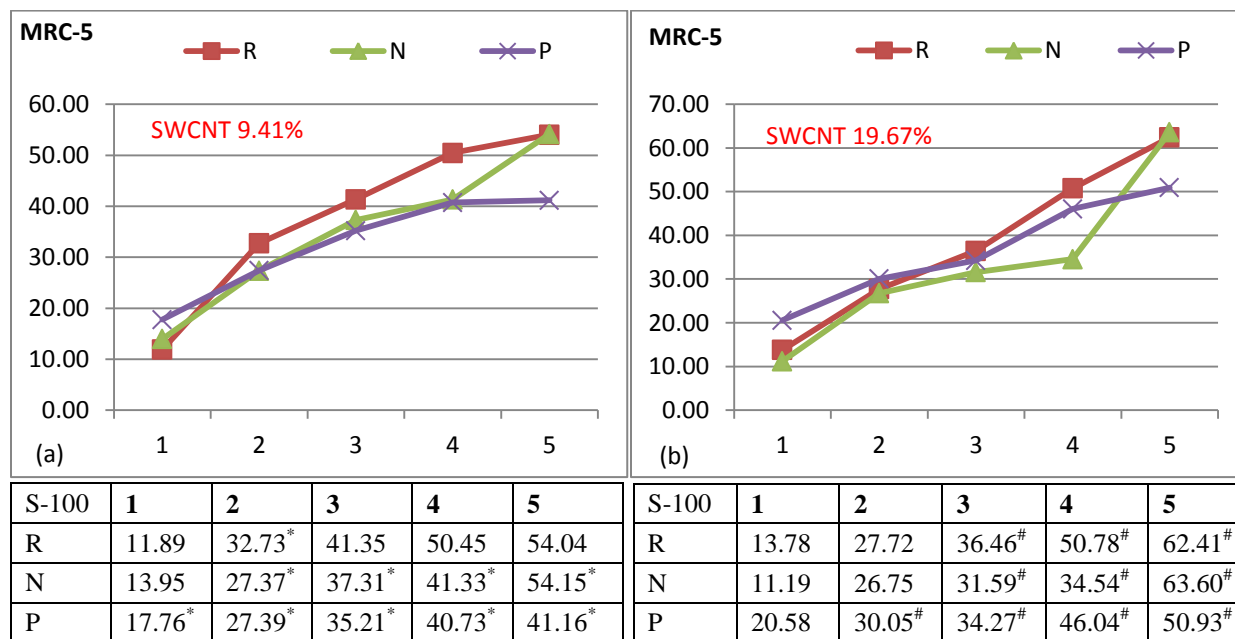


Grafikon 4.3. Uticaj različitih koncentracija SWCNT, resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola na proliferaciju MRC-5 ćelija nakon inkubacije u toku 24h (a) i 48h (b). Realne koncentracije 1-5 za svaku supstancu prikazane su u tabeli 3.2. u Materijalu i metodama

4.1.4. Ispitivanje citotoksične aktivnosti kombinacije SWCNT (100 µg/mL) sa resveratrolom, N-acetil cisteinom i proantocijanidolima prema MRC-5 ćelijskoj liniji

Na osnovu rezultata prikazanih na grafikonima 4.4a i 4.4b utvrđeno je da su kotretmani 100 µg/mL SWCNT sa 25 µg/mL resveratrola, odnosno 1,5 µg/mL N-acetil cisteina, tokom 24h doveli do blagog povećanja citotoksičnosti u poređenju sa tretmanom sa 100 µg/mL SWCNT, ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno. Za razliku od navedenih kotretmana, kod svih ostalih ispitivanih kombinacija utvrđeno je statistički značajno povećanje citotoksične aktivnosti, uključujući i najnižu koncentraciju proantocijanidola (5 µg/mL) u kombinaciji sa SWCNT, koja je imala skoro dva puta veći procenat citotoksičnosti nego samostalan tretman sa SWCNT (9,41 vs 17,76). Povećanjem koncentracija antioksidanata, odnosno kombinacijom 100 µg/mL SWCNT sa 50 µg/mL resveratrola, 3 µg/mL N-acetil cisteina ili 10 µg/mL proantocijanidola primećuje se tri puta izraženiji antiproliferativni efekat u odnosu na tretman sa 100 µg/mL SWCNT. Kombinacijom visokih koncentracija antioksidanata sa 100 µg/mL SWCNT tokom 24h postiže se antiproliferativni efekat koji smanjuje populaciju ćelija za oko 50%. Tokom perioda inkubacije od 48h antiproliferativni efekat kombinacija SWCNT sa ispitivanim antioksidantima zavisi pre svega od koncentracije antioksidanata, odnosno sa povećanjem njihove koncentracije, antiproliferativni efekat je bio izraženiji. Kombinacije 100 µg/mL SWCNT sa 5 µg/mL proantocijanidola, 25 i 50 µg/mL resveratrola i 1,5 i 3 µg/mL N-acetilcisteina nisu statistički značajno uticale na promenu procenta citotoksičnosti, za razliku od kombinacija SWCNT sa visokim koncentracijama antioksidanata gde se primećuje statistički značajno povećanje citotoksičnosti.

Na grafikonu 4.4. prikazano je antiproliferativno delovanje fiksne koncentracije SWCNT (100 µg/mL) sa rastućim koncentracijama resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola, primenom MTT testa.

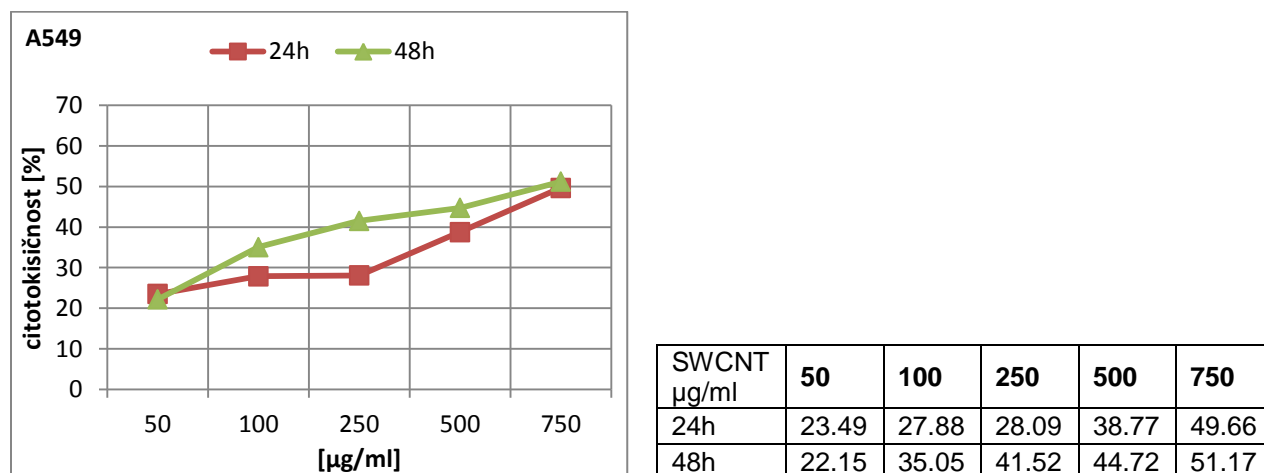


Grafikon 4.4. Uticaj 100 µg/mL SWCNT u kombinaciji sa resveratrolom, N-acetil cisteinom i proantocijanidolima na proliferaciju MRC-5 ćelija nakon inkubacije u toku 24h (a) i 48h (b) * $p < 0,05$ vs. SWCNT-100 24h; # $p < 0,05$ vs. SWCNT-100 48h; Realne koncentracije 1-5 za svaku supstancu prikazane su u tabeli 3.2. u Materijalu i metodama

4.1.5. Ispitivanje citotoksične aktivnosti SWCNT prema A549 ćelijskoj liniji

Na osnovu prikazanih rezultata koji su dobijeni tretiranjem A549 ćelijske linije sa SWCNT u rasponu koncentracija od 50 do 750 $\mu\text{g/mL}$ zabeležena je antiproliferativna aktivnost, a stepen inhibicije zavisi kako od koncentracije, tako i od dužine tretmana. Pri koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT za oba inkubaciona perioda postiže se ujednačen citotoksični odgovor od 22-23,5%. Najveća razlika u antiproliferativnom odgovoru primećuje se pri koncentraciji od SWCNT od 250 $\mu\text{g/mL}$, gde za inkubacioni period od 24h procenat inhibicije iznosio 28%, a nakon perioda inkubacije od 48h taj procenat je na nivou 42%. Pri najvećoj aplikovanoj koncentraciji u oba inkubaciona perioda postiže se sličan antiproliferativni efekat, odnosno dolazi do smanjenja broja ćelija za oko 50%.

Na grafikonu 4.5. prikazano je delovanje SWCNT na proliferaciju A549 ćelija, primenom MTT testa.

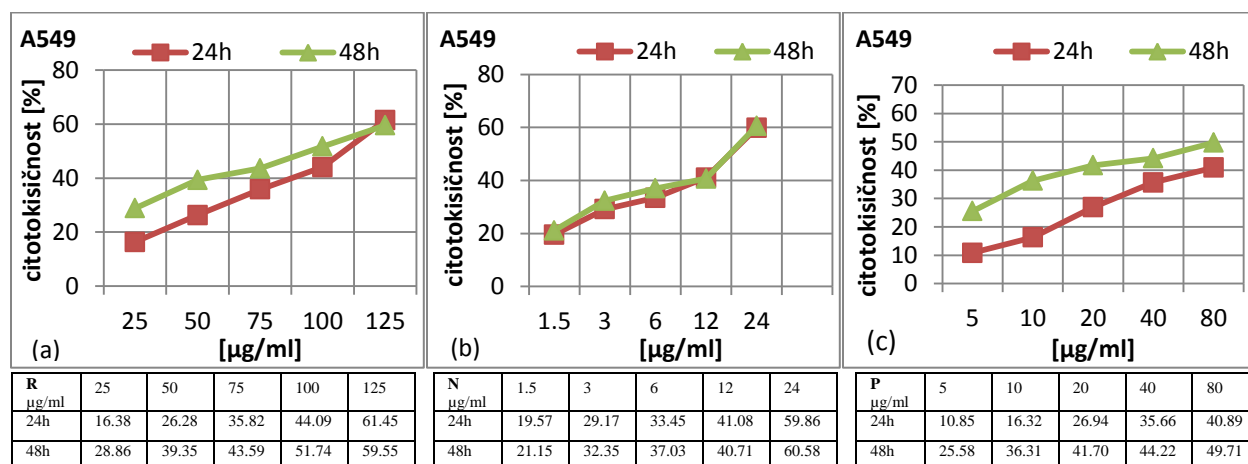


Grafikon 4.5. Uticaj SWCNT na proliferaciju A549 ćelija nakon inkubacije u toku 24h i 48h

4.1.6. Ispitivanje citotoksične aktivnosti resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola prema A549 ćelijskoj liniji

Citotoksična aktivnost resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola prema ćelijskoj liniji A549 prikazana je na grafikonu 4.6. U opsegu ispitivanih koncentracija navedenih antioksidanata, utvrđena je koncentracijski zavisna citotoksična aktivnost nakon perioda inkubacije od 24, odnosno 48h. Pri istim koncentracijama N-acetil cisteina antiproliferativni efekat je bio sličan u oba inkubaciona perioda, za razliku od tretmana sa resveratrolom i proantocijanidolima koji pri niskim koncentracijama dovode do slabijeg antiproliferativnog efekta nakon trajanja tretmana od 24h u poređenju sa tretmanom od 48h.

Na grafikonu 4.6. prikazano je delovanje resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola na proliferaciju A549 ćelija, primenom MTT testa.

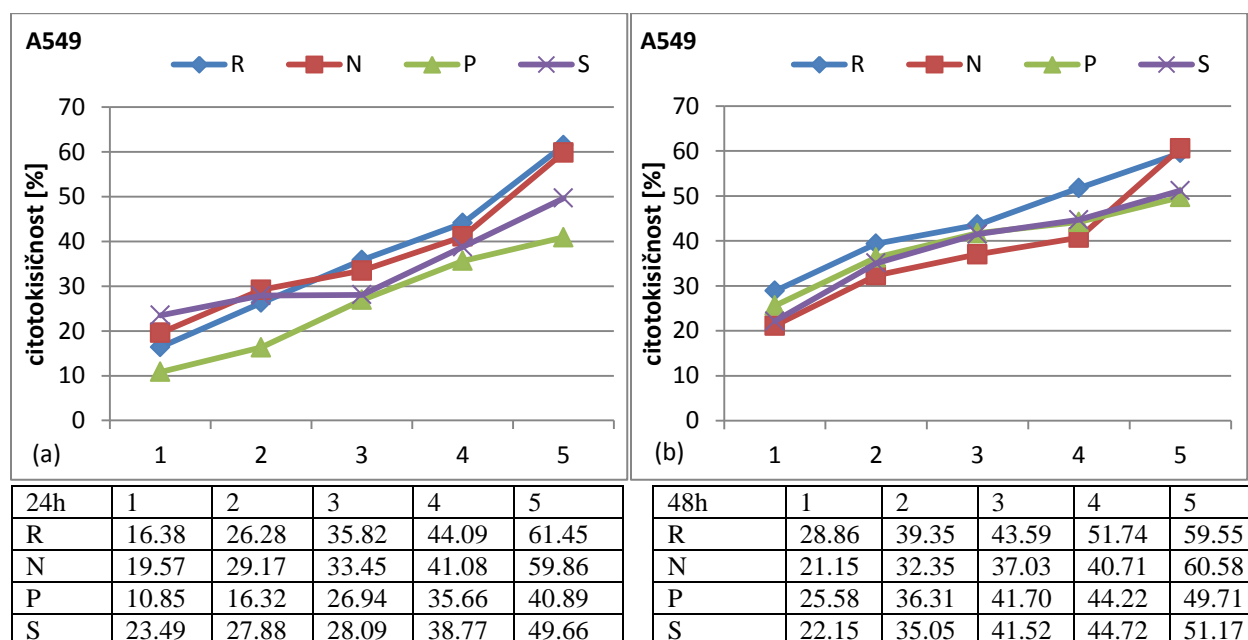


Grafikon 4.6. Uticaj različitih koncentracija (a) resveratrola, (b) N-acetil cisteina i (c) proantocijanidola na proliferaciju A549 ćelija nakon inkubacije u toku 24h i 48h

4.1.7. Ispitivanje citotoksične aktivnosti SWCNT, resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola prema A549 ćelijskoj liniji

Na osnovu rezultata prikazanih na grafikonu 4.7. utvrđen je koncentracijski zavisni porast citotoksičnosti nakon tretmana sa ispitivanim supstancama tokom oba perioda inkubacije. Tretman sa niskim koncentracijama resveratrola i proantocijanidola pokazao je slabiji antiproliferativni efekat nakon ćelijskog tretmana u trajanju od 24h u poređenju sa tretmanom istim koncentracijama tokom 48h. Sa koncentracijom od 50 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT, procenat citotoksičnosti bio je sličan za oba perioda inkubacije, dok je nakon tretmana A549 ćelija sa 100 $\mu\text{g/ml}$ SWCNT izraženiji antiproliferativni efekat bio nakon tretmana od 48h. Pri tretmanu visokim koncentracijama ispitivanih supstanci, citotoksični efekat je bio sličan tokom oba perioda inkubacije.

Na grafikonu 4.7. prikazano je delovanje SWCNT, resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola na proliferaciju A549 ćelija, primenom MTT testa

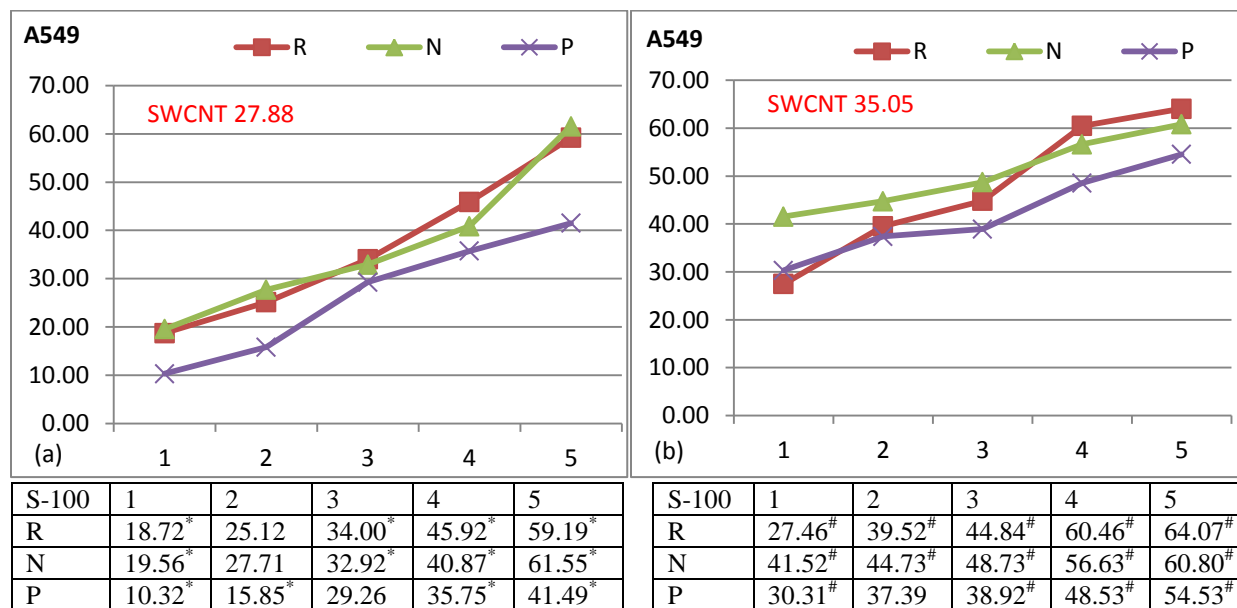


Grafikon 4.7. Uticaj SWCNT, resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola na proliferaciju A549 ćelija nakon inkubacije u toku 24h (a) i 48h (b) realne koncentracije 1-5 za svaku supstancu prikazane su u tabeli 3.2. u Materijalu i metodama

4.1.8. Ispitivanje citotoksične aktivnosti kombinacije SWCNT (100 µg/ml) sa resveratrolom, N-acetil cisteinom i proantocijanidolima prema A549 ćelijskoj liniji

Na osnovu prikazanih rezultata utvrđeno je da su tokom 24h kombinacije 100 µg/mL SWCNT sa najnižim ispitivanim koncentracijama resveratrola (25 µg/mL), N-acetil cisteina (1,5 µg/mL) i dve najniže ispitivane koncentracije proantocijanidola (5 i 10 µg/mL) statistički značajno smanjile citotoksičnost u poređenju sa samostalnim tretmanom sa 100 µg/mL SWCNT. Najizraženije smanjenje citotoksičnosti uočeno je sa kombinacijama 100 µg/mL SWCNT sa 5, odnosno 10 µg/mL proantocijanidola gde je tokom tretmana citotoksični odgovor bio dva do tri puta manji od citotoksičnog efekta samostalnog tretmana sa SWCNT. Kombinacije 100 µg/mL SWCNT sa 20 µg/mL proantocijanidola, 3 µg/mL N-acetil cisteina i 50 µg/mL resveratrola nisu pokazale statistički značajnu promenu citotoksičnosti tokom perioda inkubacije od 24h. Daljim povećanjem koncentracija antioksidanata u kombinaciji sa 100 µg/mL SWCNT primećuje se snažno i statistički značajno povećanje antiproliferativnog efekta svih ispitivanih kombinacija. Tokom perioda inkubacije od 48h uočava se da kombinacija 100 µg/mL SWCNT sa svim ispitivanim koncentracijama N-acetil cisteina dovodi do statistički značajnog povećanja citotoksičnosti u odnosu na tretman sa 100 µg/mL SWCNT. Jedino tretman A549 ćelija kombinacijom 100 µg/mL SWCNT sa 5 µg/mL proantocijanidola, odnosno 25 µg/mL resveratrola statistički značajno smanjuje procenat citotoksičnosti. Kombinacije SWCNT sa visokim koncentracijama ispitivanih antioksidanata statistički značajno povećavaju citotoksičnost u odnosu na tretman sa 100 µg/mL SWCNT.

Na grafikonu 4.8. prikazano je antiproliferativno delovanje fiksne koncentracije SWCNT (100 µg/mL) sa rastućim koncentracijama resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola, primenom MTT testa



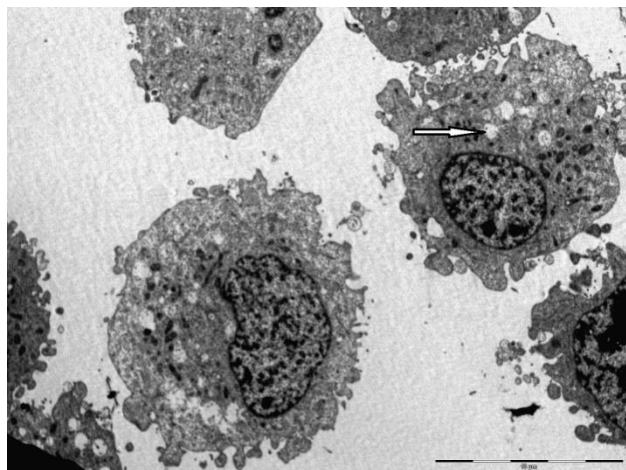
Grafikon 4.8. Uticaj 100 µg/mL SWCNT u kombinaciji sa resveratrolom, N-acetil cisteinom i proantocijanidolima na proliferaciju A549 ćelija nakon inkubacije u toku 24h (a) i 48h (b) * $p < 0,05$ vs. SWCNT-100 24h; # $p < 0,05$ vs. SWCNT-100 48h. Realne koncentracije 1-5 za svaku supstancu prikazane su u tabeli 3.2. u Materijalu i metodama

4.2. Rezultati analize MRC-5 i A549 ćelija transmisionim elektronskim mikroskopom

U cilju da se ispita tačna lokalizacija jednoslojnih ugljeničnih nanocevi u ispitivanim ćelijama, kao i vrsta interakcije, uticaj na morfološke promene i potencijalna ćelijska oštećenja, MRC-5 i A549 ćelije su analizirane transmisionom elektronskom mikroskopijom. TEM analizom ispitane su MRC-5 i A549 ćelije tretirane sa 100 $\mu\text{g/ml}$ SWCNT, kao i ćelije tretirane kombinacijom 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT sa 50 $\mu\text{g/mL}$ resveratrola tokom 24h. Netretirane MRC-5 odnosno A549 ćelije korišćene su kao kontrola.

4.2.1. Rezultati ispitivanja MRC-5 ćelija transmisionim elektronskim mikroskopom

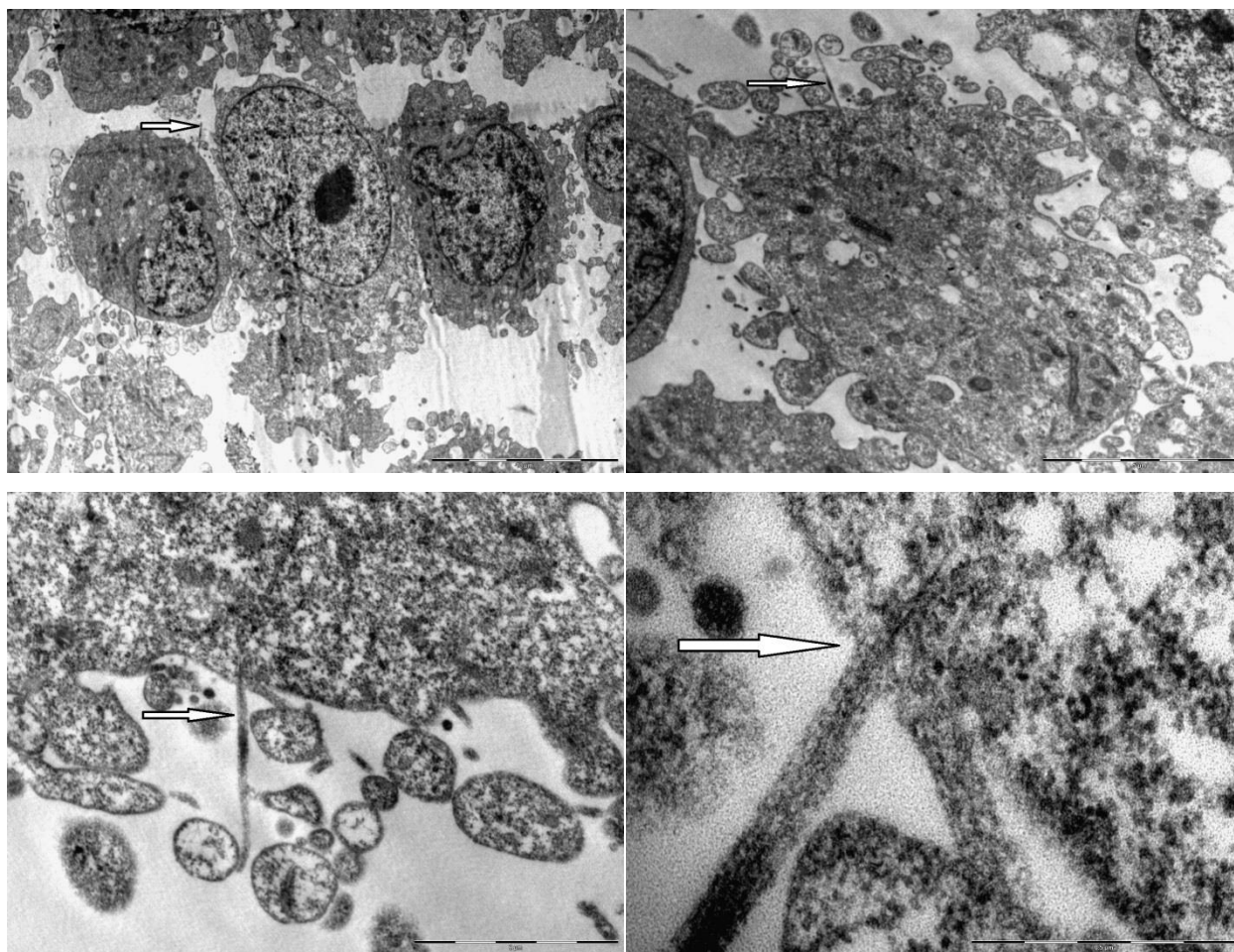
Na osnovu rezultata dobijenih posmatranjem netretiranih MRC-5 ćelija (kontrola), primećeno je da su ispitivane kontrolne ćelije imale karakteristične ultrastrukturne odlike ove ćelijske linije sa pojedinačnim praznim vezikulama koje su bile prisutne u nekim ćelijama. (slika 4.1.)



Slika 4.1. Transmisiona elektronska mikroskopija kontrolnih MRC-5 ćelija. Strelica ukazuje na prisustvo praznih vezikula.

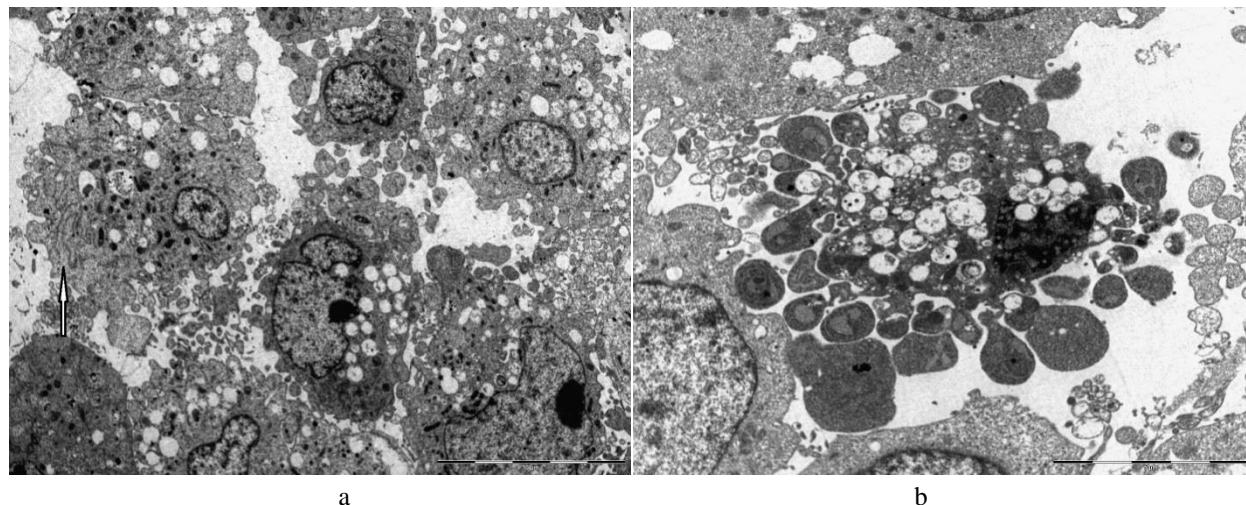
U uzorcima MRC5 ćelija tretiranih sa 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT uočene su ugljenične nanocevi u prostorima izvan ćelija kao i nanocevi koje su bile u kontaktu sa ćelijama. SWCNT koje su viđene izvan ćelija ili u kontaktu sa ćelijama viđene su kao cilindrične strukture, dužine do 2 μm , sastavljene od snopova cilindara ukupnog prečnika 20-30 nm. SWCNT u kontaktu sa

ćelijama uočavane su kao cilindrične strukture, koje pod pravim uglom ili ređe pod oštrim uglom prolaze kroz ćelijsku membranu, dok su u citoplazmi viđeni pojedinačni nanocilindri prečnika mnogo manjeg od 10 nm (veličine ispod tehničkih mogućnosti merenja). U uzorcima ćelija tretiranih sa SWCNT pored praznih vezikula viđene su i brojne vezikule u kojima su strukture koje svojim karakteristikama podsećaju na preseke ugljeničnih nanocevi.



Slika 4.2. Transmisiona elektronska mikroskopija MRC-5 ćelija tretiranih sa SWCNT. Strelice ukazuje na lokalizaciju ugljeničnih nanocevi.

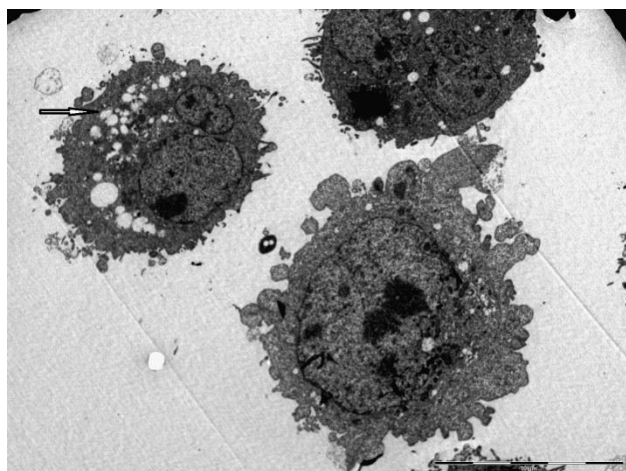
Posmatranjem MRC5 ćelije tretiranih kombinacijom 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SWCNT sa 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resveratrola primećuje se da ćelije pored vezikula u svojoj citoplazmi, imaju i prominentan endoplazmatski retikulum (slika 4.3.-a). Takođe, uočene su i pojedinačne apoptotske ćelije, što je u skladu sa rezultatima ispitivanja apoptoze protočnom citometrijom, gde je takođe utvrđeno da kombinacija SWCNT sa resveratrolom dovodi do većeg procenta specifične apoptoze u odnosu na tretman samo sa SWCNT.



Slika 4.3. Transmisiona elektronska mikroskopija MRC-5 ćelija tretiranih sa kombinacijom SWCNT i resveratrola. (a) MRC-5 ćelija sa prominentnim endoplazmatskim retikulumom nakon tretmana i (b) apoptotska MRC-5 ćelija. Strelice ukazuje na prominentan endoplazmatski retikulum primećen nakon kotretmana sa SWCNT i resveratrolom.

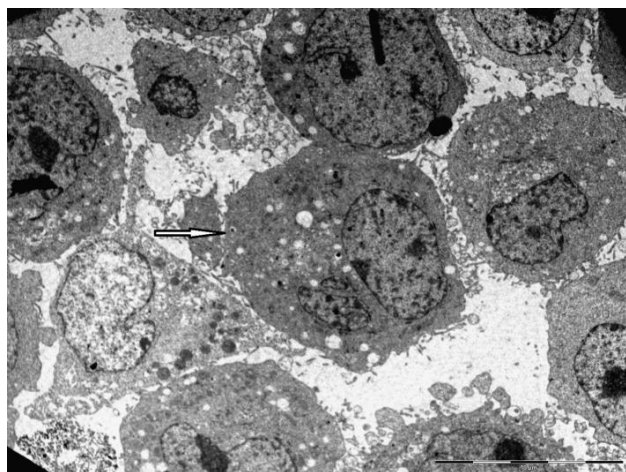
4.2.2. Rezultati ispitivanja A549 ćelija transmissionim elektronskim mikroskopom

Na osnovu rezultata dobijenih posmatranjem netretiranih A549 ćelija (kontrola), primećeno je da su ispitivane kontrolne ćelije imale karakteristične ultrastrukturne odlike ove ćelijske linije sa pojedinačnim praznim vezikulama koje su bile prisutne u nekim ćelijama. (slika 4.4.)



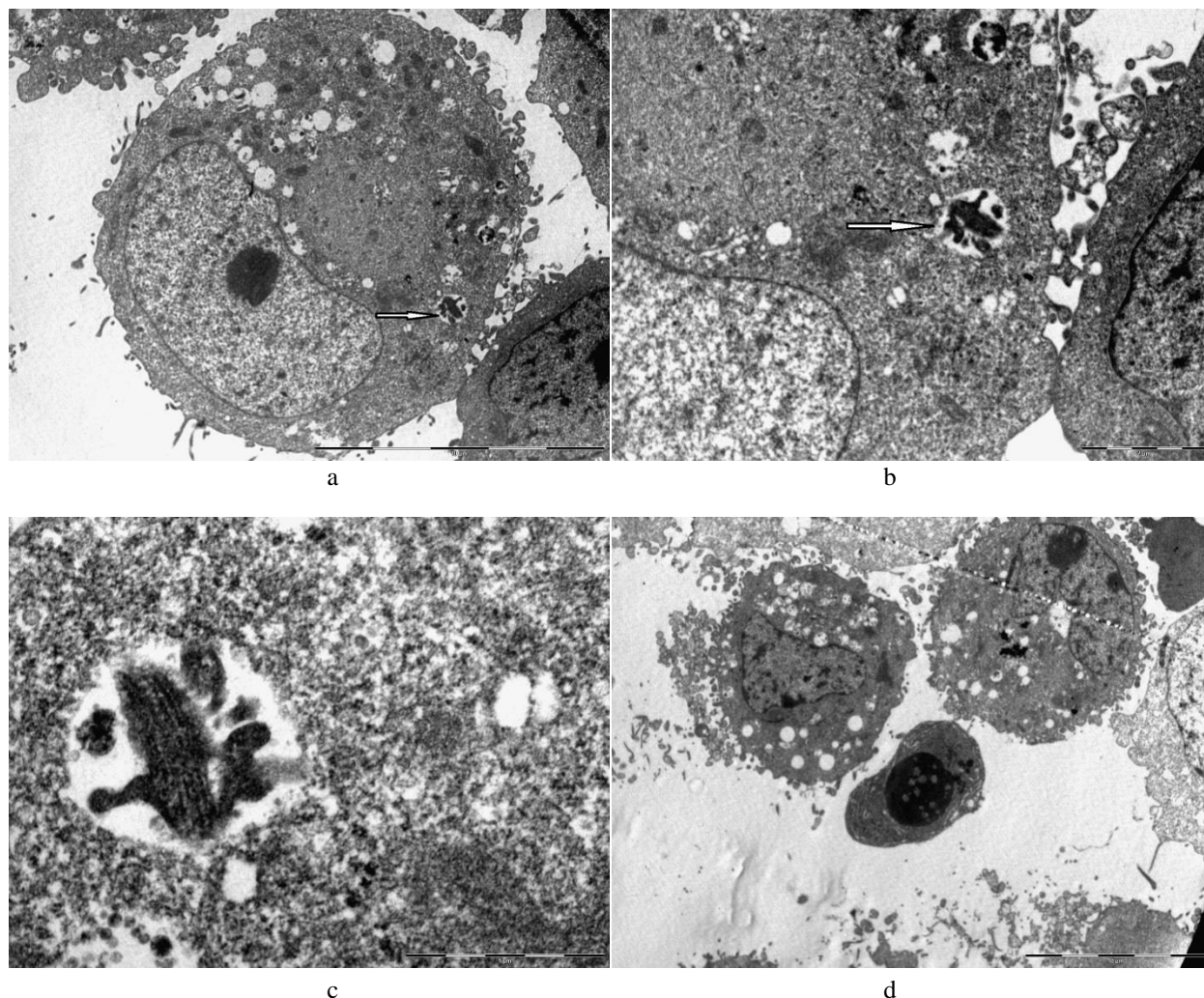
Slika 4.4. Transmission elektronska mikroskopija kontrolnih A549 ćelija. Strelica ukazuje na prisustvo praznih vezikula.

U uzorcima A549 ćelija tretiranih sa 100 $\mu\text{g/mL}$ jednoslojnih ugljeničnih nanocevi viđene su brojne vezikule od kojih su neke imale materijal koji liči na presek nanocilindra.



Slika 4.5. Transmission elektronska mikroskopija A549 ćelija tretiranih sa SWCNT. Strelica ukazuje na unutarćelijsku lokalizaciju ugljeničnih nanocevi.

TEM analizom uzoraka A549 ćelija tretiranih kombinacijom SWCNT sa resveratrolom uočene su brojne vezikule u kojima se nalazio i materijal koji je po elektronskoj gustini i izgledu sličan ugljeničnim nanocevima (slika 4.6.- a,b i c). Slično kao i kotretman MRC-5 ćelija, nakon tretmana kombinacijom SWCNT sa resveratrolom raste procenat specifične apoptoze u odnosu na tretman samo sa SWCNT što je uočeno i analizom elektronskim mikroskopom, gde se primećuje veći broj apoptotskih ćelija (slika 4.6 -d).



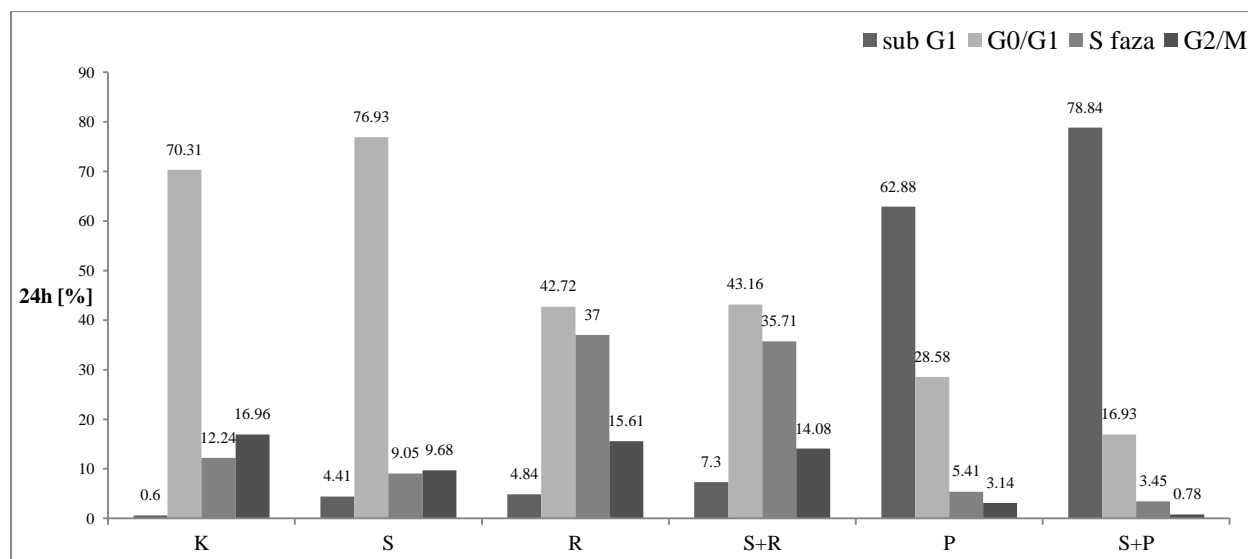
Slika 4.6. Transmisiona elektronska mikroskopija A549 ćelija tretiranih kombinacijom SWCNT sa resveratrolom. SWCNT prisutne u vezikulama A549 ćelija(a,b,c) i apoptotska A549 ćelija (d). Strelice ukazuje na unutarćelijsku lokalizaciju ugljeničnih nanocevi.

4.3. Rezultati ispitivanja modulacije ćelijskog ciklusa

U cilju određivanja osetljivosti MRC-5 i A549 ćelija na delovanje SWCNT, resveratrola i proantocijanidola pojedinačno, kao i u kombinaciji SWCNT sa dva navedena antioksidanta, ćelije su tretirane tokom 24 h sa 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SWCNT; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resveratrola; 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ proantocijanidola pojedinačno i kombinacijom 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SWCNT + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resveratrola odnosno 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ proantocijanidola, nakon čega je analiziran uticaj navedenih tretmana na ćelijski ciklus.

Distribucija ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa (subG1, G0/G1, S i G2/M) analizirana je merenjem sadržaja ćelijske DNK u MRC-5 odnosno A549 ćelijama, nakon čega je izračunat procenat ćelija u svakoj navedenoj fazi ćelijskog ciklusa. Frakcija ćelija u subG1 fazi je posmatrana kao populacija apoptotičnih ćelija.

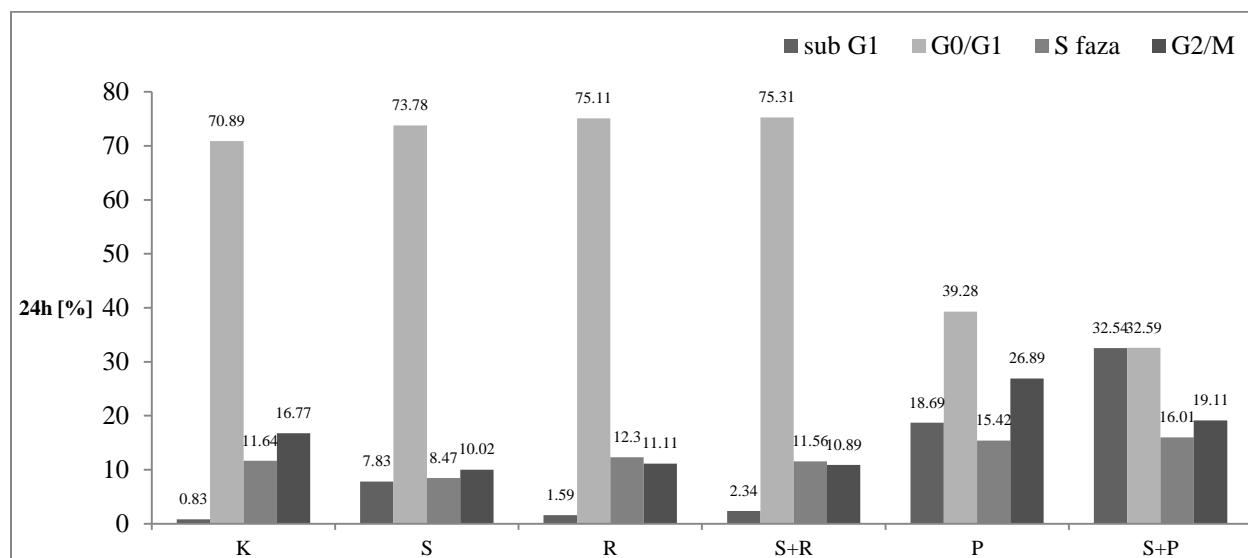
Izračunata procentualna zastupljenost MRC-5 ćelija u subG1, G0/G1, S i G2/M fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana sa ispitivanim jedinjenjima, uporedno sa netretiranim ćelijama kao kontrolom, prikazana je na grafikonu 4.9.



Grafikon 4.9. Distribucija faza ćelijskog ciklusa MRC-5 ćelija izražena kao procenat (%) po fazama ćelijskog ciklusa (K- kontrola; S- 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SWCNT, 24 h; R- 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resveratrola, 24 h; S+R- 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SWCNT + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ R, 24 h; P- 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SWCNT + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P, 24 h).

U MRC-5 ćelijskoj liniji SWCNT su nakon 24h tretmana jedine indukovale porast broja ćelija u G0/G1 fazi, dok su tretmani sa resveratrolom, proantocijanidolima i kombinacijama SWCNT sa antioksidantima (S+R, odnosno S+P) smanjile ćelijsku populaciju u ovoj fazi ćelijskog ciklusa. Procenat ćelija u sintetskoj (S) fazi ćelijskog ciklusa blago je umanjen delovanjem SWCNT, dok su tretmani sa proantocijanidolima, a posebno kombinacija SWCNT sa ovim antioksidantom indukovali izraženije umanjenje populacije ćelija u ovoj fazi ćelijskog ciklusa. Međutim, tretman ćelija resveratrolom i kombinacijom SWCNT sa resveratrolom indukovao je porast broja ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa. Procenat ćelija u G2/M fazi bio je na nivou kontrole nakon tretmana MRC-5 ćelija sa resveratrolom pojedinačno i u kombinaciji sa SWCNT, dok je značajno smanjenje broja ćelija u ovoj fazi ćelijskog ciklusa primećeno u tretmanima sa SWCNT i proantocijanidolima pojedinačno i u kombinaciji navedenih supstanci (~ 1,5x manje nakon tretmana sa SWCNT, ~5x manje za tretman sa proantocijanidolima i ~21x manje nakon tretmana kombinacijom SWCNT sa proantocijanidolima). Najveće smanjenje ćelija u G2/M fazi (manje od 1%) indukovano je tretmanom kombinacijom S+P. Ćelije koje su u subG1 fazi ćelijskog ciklusa smatraju se populacijom apoptotskih ćelija zbog čega su u ovom istraživanju od posebnog interesa. Kod svih uzoraka primećeno je povećanje populacije MRC-5 ćelija u subG1 fazi, a najveći porast u poređenju sa kontrolom indukovao je tretmanom sa proantocijanidolima i kombinacijom S+P.

Procentualna zastupljenost A549 ćelija u subG1, G0/G1, S i G2/M fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana sa ispitivanim jedinjenjima uporedno sa netretiranim ćelijama kao kontrolom, prikazana je na grafikonu 4.10.



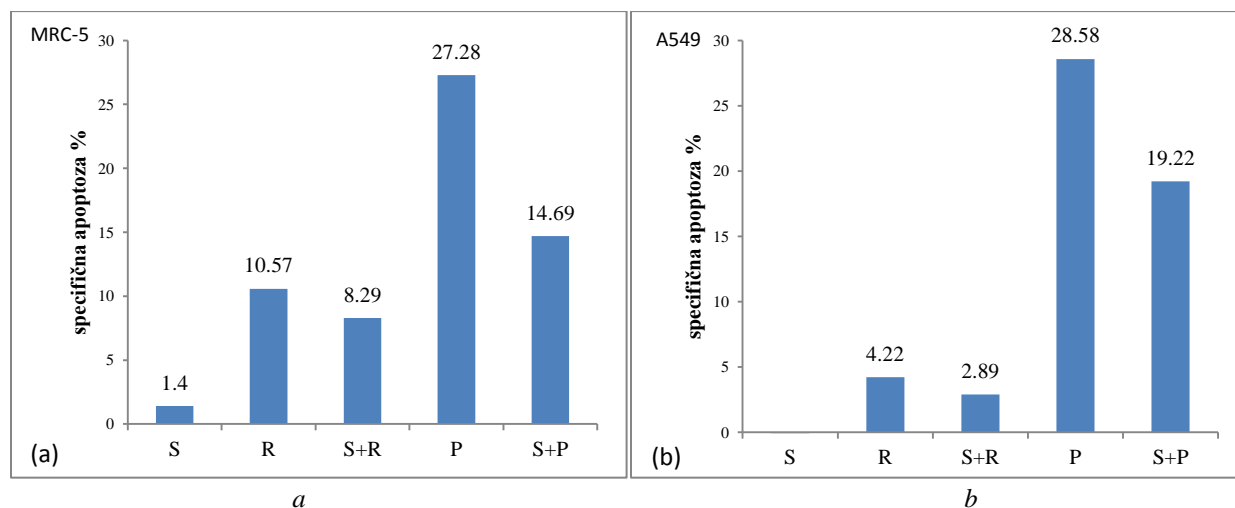
Grafikon 4.10. Distribucija faza ćelijskog ciklusa A549 ćelija izražena kao procenat (%) po fazama ćelijskog ciklusa (K- kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h).

Posle tretmana sa svakom od navedenih supstanci kao i njihovim kombinacijama najveći deo ćelija je bio u G0/G1 fazi. Nakon tretmana sa SWCNT i resveratrolom, pojedinačno i u kombinaciji, procenat ćelija u G0/G1 fazi nije se značajnije menjao i bio je na nivou kontrole, dok su tretmani sa proantocijanidolima pojedinačno i u kombinaciji sa SWCNT smanjili procenat ćelija u ovoj fazi ćelijskog ciklusa. Svi tretmani indukovali su male promene u sintetskoj (S) fazi ćelijskog ciklusa tako da su procenti ćelija bili prilično uniformni bez obzira na vrstu tretmana. Blago smanjenje procenta ćelija u G2/M fazi primećuje se nakon tretmana sa SWCNT i resveratrolom, pojedinačno i u kombinaciji, dok su proantocijanidoli i kombinacija S+P indukovali umereno povećanje broja ćelija u ovoj fazi. Broj apoptotskih ćelija, odnosno broj ćelija u sub G1 fazi povećava se nakon pojedinačnog tretmana sa SWCNT ili proantocijanidolima, ali i njihovom kombinacijom. Zapravo, najveći porast broja ćelija u sub G1 fazi (~33%) indukuje upravo kombinacija SWCNT sa proantocijanidolima. Tretman A549 ćelija sa resveratrolom pojedinačno i u kombinaciji sa SWCNT dovodi samo do blagog povećanja broja ćelija u sub G1 fazi u odnosu na kontrolu.

4.4. Rezultati ispitivanja apoptoze i nekroze protočnom citometrijom

Indukcija apoptoze i nekroze MRC-5 i A549 ćelija delovanjem SWCNT, resveratrola, proantocijanidola i kombinacijom SWCNT sa dva navedena antioksidanta ispitivana je protočnom citometrijom pomoću FACS (*Fluorescence Activated Sorting Cells*) imunocitometrijskog sistema koji čine protočni citometar *BD FACSCalibur E440* i kompjuterski program *BD Cell Quest Pro* (*Becton Dickinson, San Diego, CA, USA*). Ista metodologija kultivacije, tretmana i sakupljanja ćelija je korišćena kao i za analizu ćelijskog ciklusa. Rezultati su dobijeni kao frakcije vijabilnih, rano-apoptotičnih, kasno-apoptotičnih i nekrotičnih ćelija. Na osnovu tih podataka određena je specifična apoptoza/nekroza u tretiranim uzorcima prema metodi Bender i sar. 2011 [73]. Spontana apoptoza i nekroza koje su bile prisutne u uzorcima netretiranih ćelija korišćene su kao kontrola za sva poređenja u ovoj studiji.

Specifična apoptoza MRC-5 i A549 ćelijskih linija indukovana tretmanom sa SWCNT, antioksidantima kao i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima određena na osnovu rezultata merenja apoptoze protočnom citometrijom, prikazana je na grafikonima 4.11a i 4.11b.

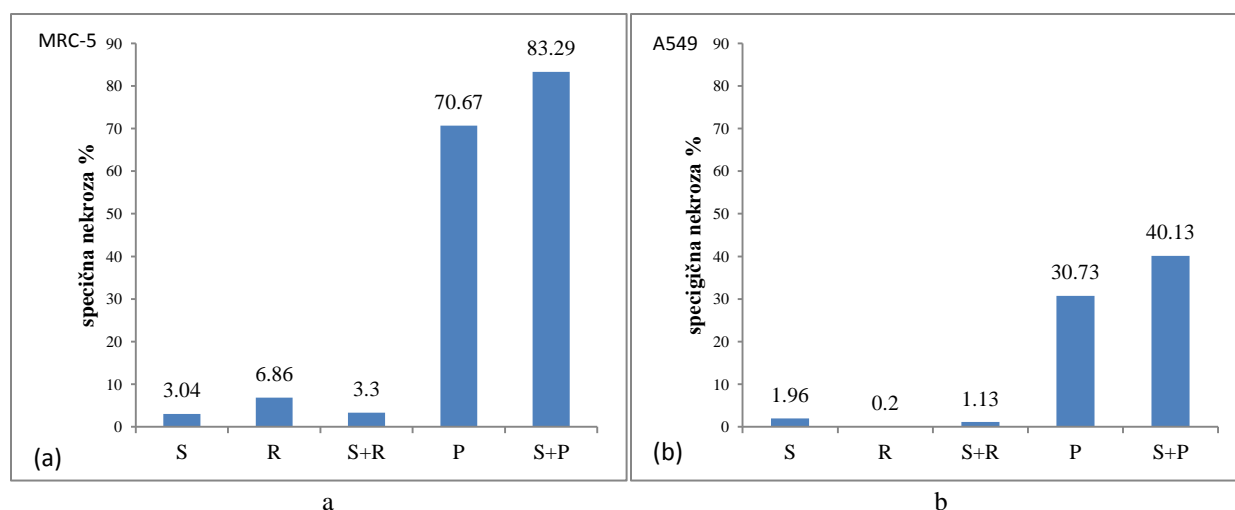


Grafikon 4.11. Specifična apoptoza MRC-5 (a) i A549 ćelija (b) S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h).

Veća indukcija apoptoze u MRC-5 ćelijama u odnosu na netretirane ćelije zabeležena je u svim tretiranim uzorcima. Najizraženiji efekat u kontekstu izazivanja specifične apoptoze imao je tretman sa proantocijanidolima pojedinačno, i u kombinaciji sa SWCNT, dok je najmanje uticaja na procenat specifične apoptoze imao tretman sa SWCNT, svega oko 1,5%. Procenat specifične

apoptoze nakon tretmana sa resveratrolom pojedinačno i u kombinaciji sa SWCNT je 10,57% odnosno 8,29%. Slični rezultati dobijeni su i u A549 ćelijskoj liniji. Kao i u MRC-5 ćelijama najprominentniji tretmani bili su sa proantocijanidolima pojedinačno, i u kombinaciji sa SWCNT. U A549 ćelijama tretiranim sa resveratrolom i kombinacijom ovog antioksidanta sa SWCNT dobijeno je povećanje broja apoptotskih ćelija, iako u proseku 3 puta manje nego u MRC-5 ćelijama. Tretman A549 ćelija sa SWCNT gotovo da nije imao uticaja na indukciju apoptoze.

Analizom na protočnom citometru zasnovanoj na Annexin V mogu se razlikovati nekrotične od apoptotičnih ćelija, a rezultati određivanja specifične nekroze MRC-5 i A549 ćelija indukovane tretmanom sa SWCNT, resveratrolom i proantocijanidolima pojedinačno kao i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazani su na grafikonima 4.12a i 4.12b.



Grafikon 4.12: Specifična nekroza MRC-5 (a) i A549 ćelija (b) S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h).

Tretman obe ispitivane ćelijske linije sa proantocijanidolima kao antioksidantima indukovao je visok procenat nekrotičnih ćelija u odnosu na netretirane, kontrolne ćelije. Sličan efekat, sa takođe visokim procentima nekrotičnih ćelija dobijen je nakon tretmana ćelija kombinacijom proantocijanidola i SWCNT. U MRC-5 ćelijskoj liniji tretmani sa SWCNT, odnosno kombinacijom SWCNT sa resveratrolom, indukovali su skoro podjednaku nekrozu nakon perioda inkubacije (oko 3%) a sličan trend je primećen i u A549 liniji nakon navedenih tretmana. Procenat indukovane specifične nekroze u A549 ćelijama iznosio je 1,96% nakon tretmana sa

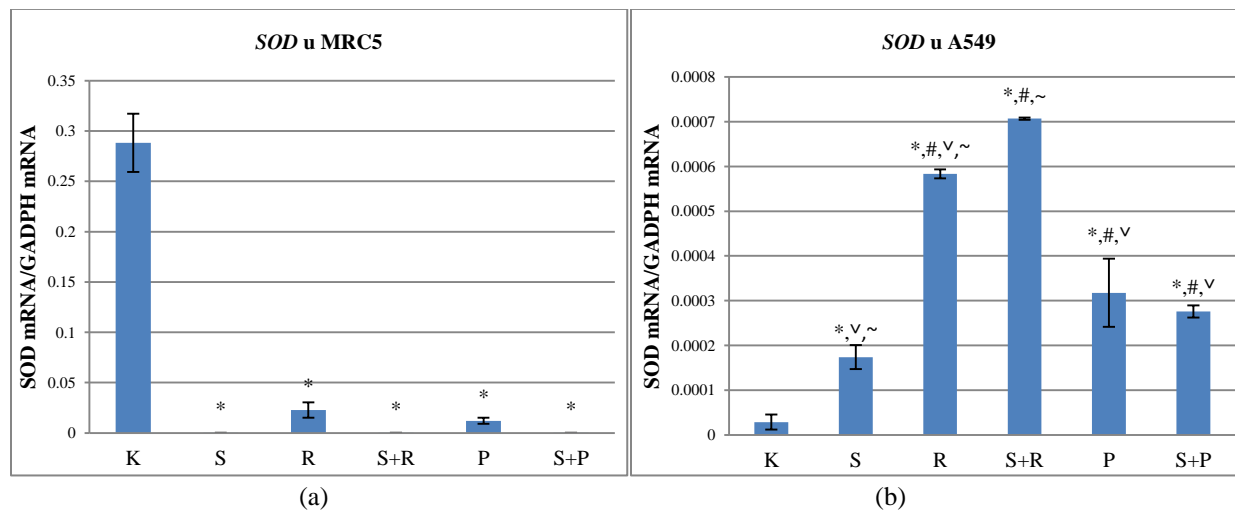
SWCNT, odnosno 1,13% nakon tretmana sa kombinacijom SWCNT i resveratrola. U A549 ćelijama najmanji uticaj na nekrozu imao je resveratrol, sa procentom specifične nekroze od svega 0,2%.

4.5. Rezultati analize ekspresije gena

U cilju određivanja delovanja SWCNT, pojedinačno i u kombinaciji sa antioksidantima, na ekspresiju odabranih gena, A549 i MRC-5 ćelije tokom 24h tretirane su pojedinačnim supstancama (100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT; 50 $\mu\text{g/mL}$ resveratrola; 10 $\mu\text{L/mL}$ proantocijanidola) i kombinacijom 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT sa 50 $\mu\text{g/mL}$ resveratrola ili 10 $\mu\text{L/mL}$ proantocijanidola. Urađena je relativna kvantifikacija 13 gena (navedenih u tabeli 3.3. u Materijalu i metodama).

4.5.1. Relativna ekspresija gena čiji su produkti uključeni u antioksidativnu zaštitu i sintezu glutaciona

Relativna ekspresija gena za SOD u normalnim, MRC-5, i malignim, A549, ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazana je na grafikonu 4.13.

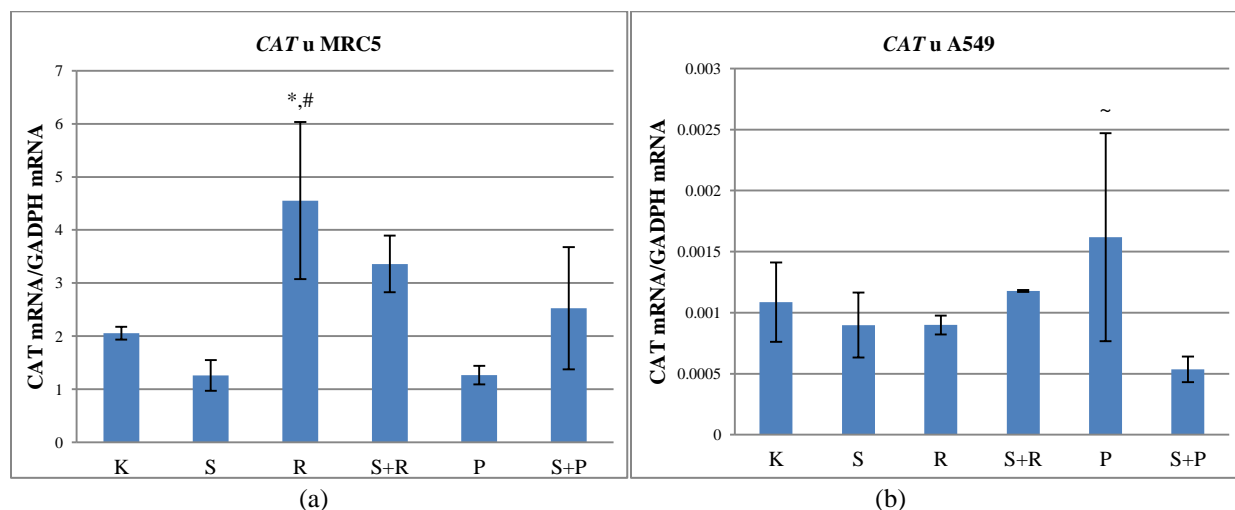


Grafikon 4.13. Relativni nivo ekspresije mRNK za SOD u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K- kontrola; S- 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT, 24 h; R- 50 $\mu\text{g/mL}$ resveratrola 24 h; S+R- 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT + 50 $\mu\text{g/mL}$ R, 24 h; P- 10 $\mu\text{g/mL}$ proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT + 10 $\mu\text{g/mL}$ P, 24 h). * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. S, ^v $p < 0,05$ vs. S+R, [~] $p < 0,05$ vs. S+P

Nakon tretmana ćelija sa SWCNT, resveratrolom ili proantocijanidolima (R, P) i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima, ekspresija gena za SOD je u MRC-5 ćelijama

značajno manja u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije ($p=0,01$). Isti tretmani su u A549 ćelijama doveli do značajno veće ekspresije gena za SOD. (grafikon 4.13.)

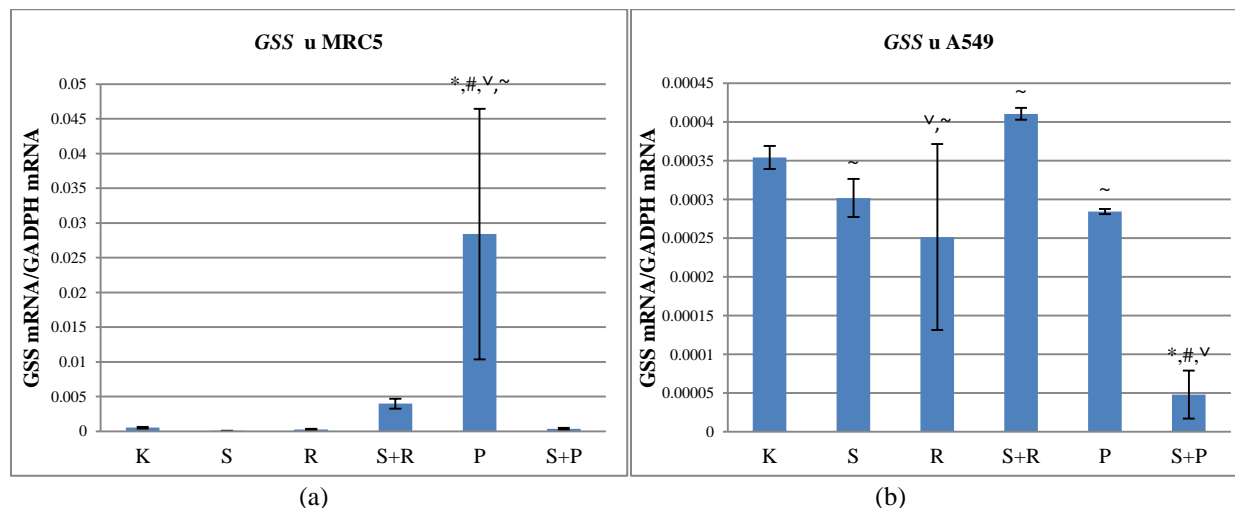
Na grafikonu 4.14. prikazani su rezultati ispitivanja relativne ekspresije CAT gena u normalnim i malignim ćelijama, tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima.



Grafikon 4.14. Relativni nivo ekspresije mRNK za CAT u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K-kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). * $p<0,05$ vs. K, # $p<0,05$ vs. S, γ $p<0,05$ vs. S+R, \sim $p<0,05$ vs. S+P

Ekspresija gena za CAT nakon tretmana MRC-5 i A549 ćelija sa SWCNT je manja u odnosu na kontrolne ćelije, iako ovo smanjenje relativne ekspresije nije statistički značajno. Jedino je tretman MRC-5 ćelija sa resveratrolom doveo do značajnog povećanja ekspresije gena za CAT u odnosu na netretirane MRC-5 ćelije. Tretman A549 ćelija sa antioksidantima i kombinacijom antioksidanata sa SWCNT nije značajno promenio ekspresiju gena za CAT (grafikon 4.14.).

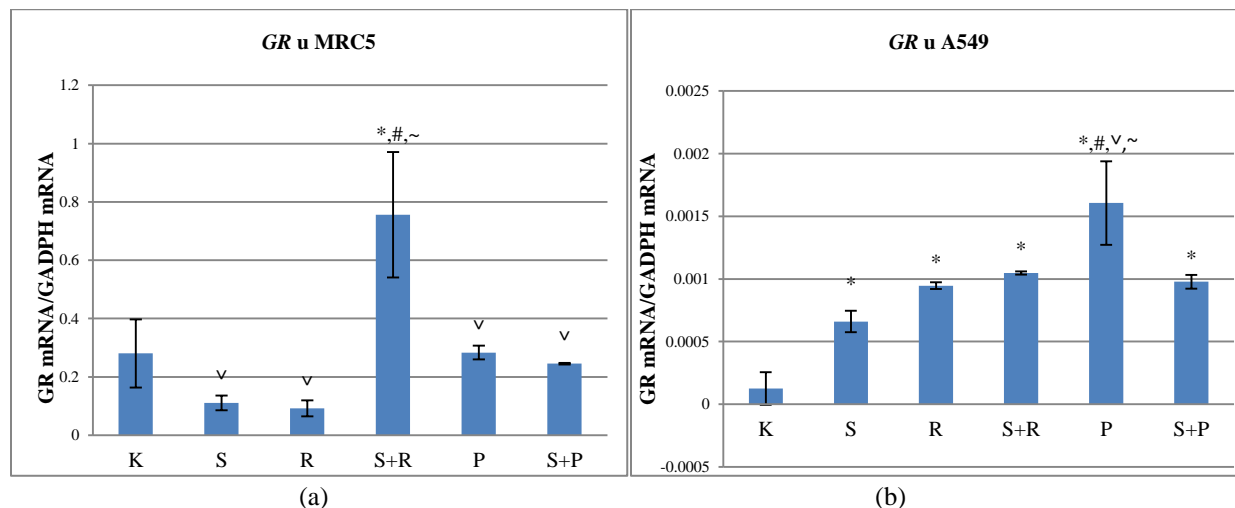
Rezultati ispitivanja relativne ekspresije gena za GSS u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazan je na grafikonu 4.15.



Grafikon 4.15. Relativni nivo ekspresije mRNK za GSS u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K- kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). *p<0,05 vs. K, #p<0,05 vs. S, ^vp<0,05 vs. S+R, ~p<0,05 vs. S+P

Ekspresija gena za GSS u MRC-5 i A549 ćelijama nije se značajno promenila nakon tretmana sa SWCNT u poređenju sa kontrolom. Povećanje ekspresije gena za GSS u MRC-5 ćelijama u odnosu na kontrolu primećeno je pri tretmanu ćelija sa proantocijanidolima, dok je kombinacija SWCNT i proantocijanidola značajno smanjila ekspresiju ovog gena u A549 ćelijama u poređenju sa kontrolom. (grafikon 4.15.)

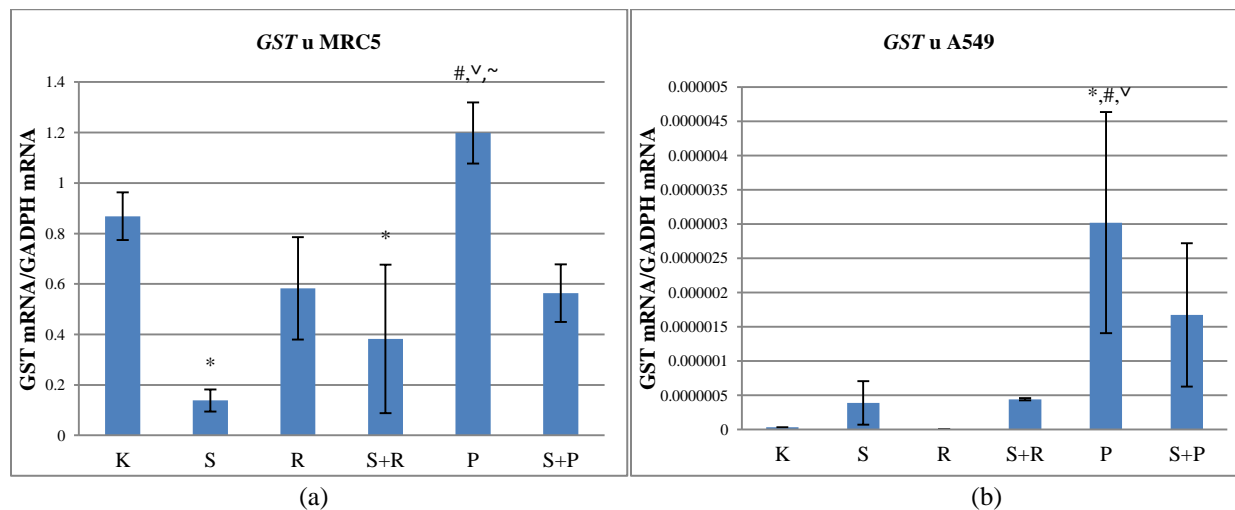
Na grafikonu 4.16. prikazani su rezultati ispitivanja relativne ekspresije gena za GR u normalnim i malignim ćelijama, tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima.



Grafikon 4.16. Relativni nivo ekspresije mRNK za GR u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K-kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). *p<0,05 vs. K, #p<0,05 vs. S, ^vp<0,05 vs. S+R, [~]p<0,05 vs. S+P

U MRC-5 ćelijskoj liniji jedino je tretman kombinacijom SWCNT i resveratrola značajno povećao ekspresiju gena za GR u odnosu na netretiranu kontrolu. Za razliku od MRC-5 ćelija gde za većinu tretmana nije bilo statistički značajne promene u ekspresiji gena za GR, u A549 ćelijama tretman i pojedinačnim supstancama i njihovim kombinacijama značajno je povećao ekspresiju gena za GR. (grafikon 4.16.)

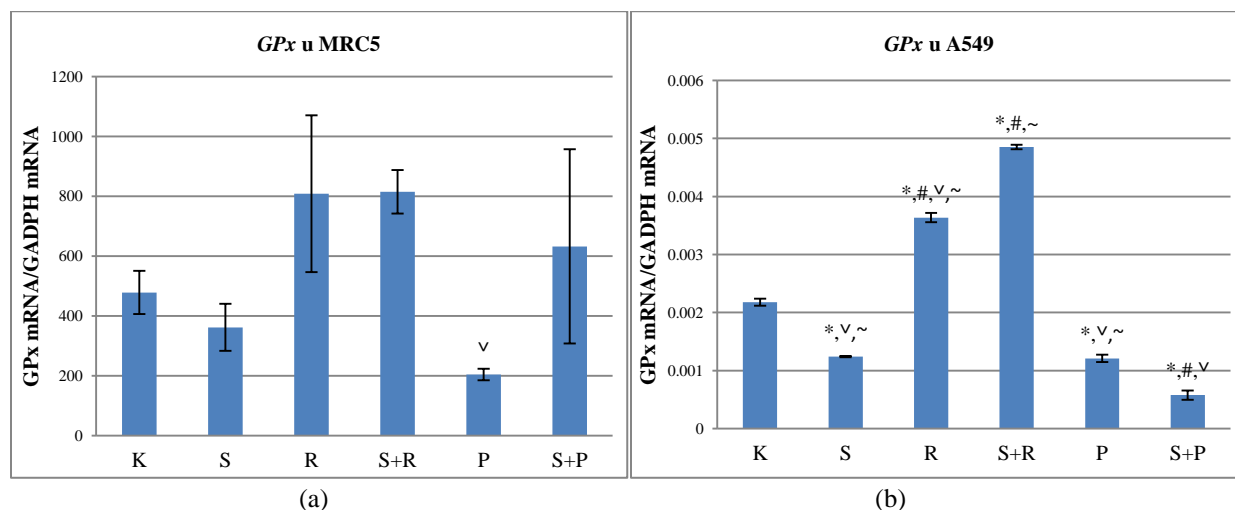
Rezultati ispitivanja relativne ekspresije gena za GST u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazan je na grafikonu 4.17.



Grafikon 4.17. Relativni nivo ekspresije mRNK za GST u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K-kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. S, $\nabla p < 0,05$ vs. S+R, $\sim p < 0,05$ vs. S+P

Statistički značajno manja ekspresija gena za GST u odnosu na kontrolne, netretirane MRC-5 ćelije uočena je prilikom tretmana ćelija sa SWCNT kao i kombinacijom SWCNT sa resveratrolom. Promena ekspresije gena za GST u A549 ćelijama uočena je jedino pri tretmanu sa proantocijanidolima koji je značajno povećao ekspresiju ovog gena (grafikon 4.17.).

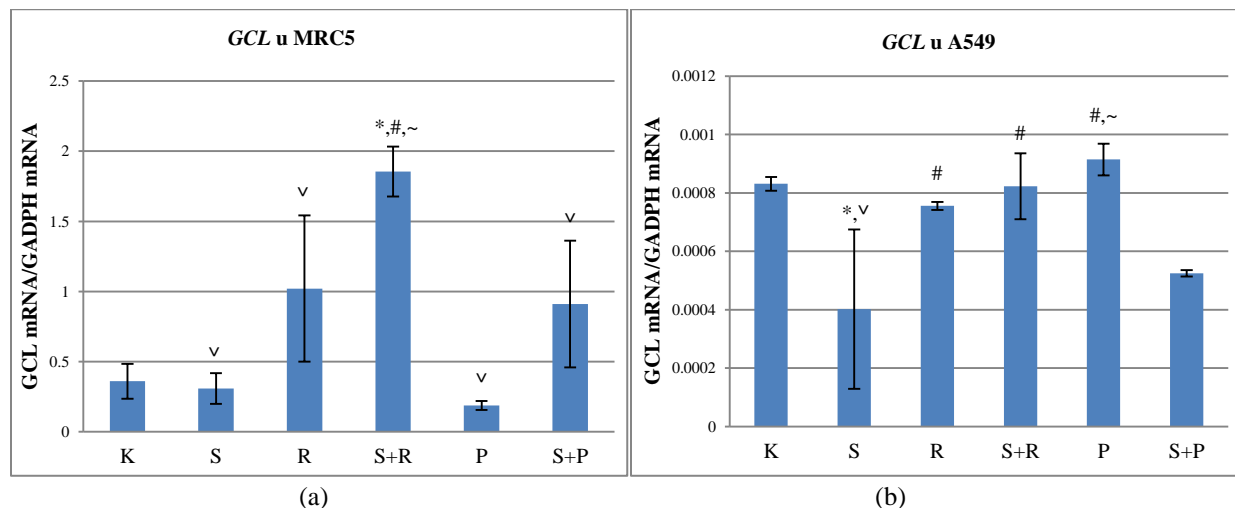
Na grafikonu 4.18. su prikazani rezultati ispitivanja relativne ekspresije gena za GPx u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima .



Grafikon 4.18. Relativni nivo ekspresije mRNK za GPx u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K-kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). *p<0,05 vs. K, #p<0,05 vs. S, ^vp<0,05 vs. S+R, [~]p<0,05 vs. S+P

Tretman MRC-5 ćelija sa SWCNT i proantocijanidolima smanjio je relativnu ekspresiju gena za GPx, ali bez statističke značajnosti. Iako su tretmani MRC-5 ćelija sa resveratrolom i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima približno dva puta povećali ekspresiju gena za GPx, ovo povećanje nije bilo statistički značajno. Za razliku od MRC-5 ćelija, gde tretmani nisu doveli do značajne promene ekspresije gena za GPx, u A549 ćelijama tretman sa SWCNT, antioksidantima kao i kombinacijama SWCNT sa antioksidantima značajno je promenio ekspresiju ovog gena. Uočljivo je smanjenje ekspresije gena za GPx nakon tretmana A549 ćelija sa SWCNT, proantocijanidolima i kombinacijom SWCNT sa proantocijanidolima, dok su resveratrol i kombinacija SWCNT sa resveratrolom povećali ekspresiju ovog gena. (grafikon 4.18.)

Rezultati ispitivanja relativne ekspresije gena za GCL u normalnim i malignim ćelijama, tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazan je na grafikonu 4.19.

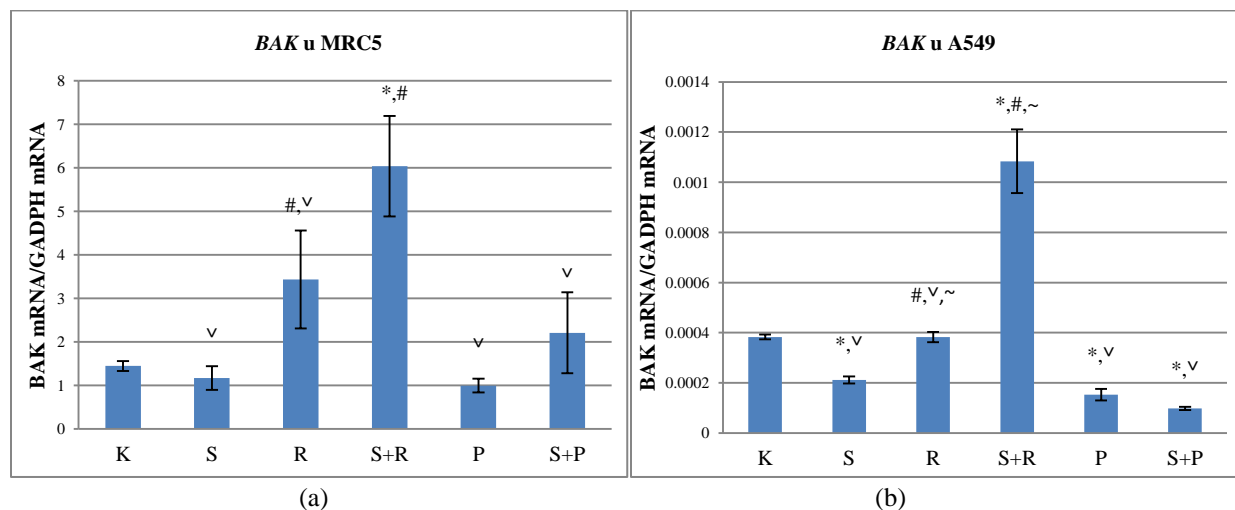


Grafikon 4.19. Relativni nivo ekspresije mRNK za GCL u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K-kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). *p<0,05 vs. K, #p<0,05 vs. S, v p<0,05 vs. S+R, ~p<0,05 vs. S+P

Analiza ekspresije gena za GCL u MRC-5 ćelijskoj liniji pokazuje da je, u odnosu na kontrolu, jedino tretman sa SWCNT u kombinaciji sa resveratrolom statistički značajno povećao njegovu ekspresiju. Za razliku od MRC-5 ćelija gde tretman sa SWCNT nije doveo do promene ekspresije ovog gena, u A549 ćelijama zabeleženo je značajno smanjenje ekspresije gena za GCL nakon tretmana sa SWCNT. Delovanje resveratrola, proantocijanidola kao i kombinacije ova dva antioksidanta sa SWCNT u A549 ćelijama nije dovelo do značajnih promena u ekspresiji ovog gena. (grafikon 4.19.)

4.5.2. Relativna ekspresija gena uključenih u proces apoptoze

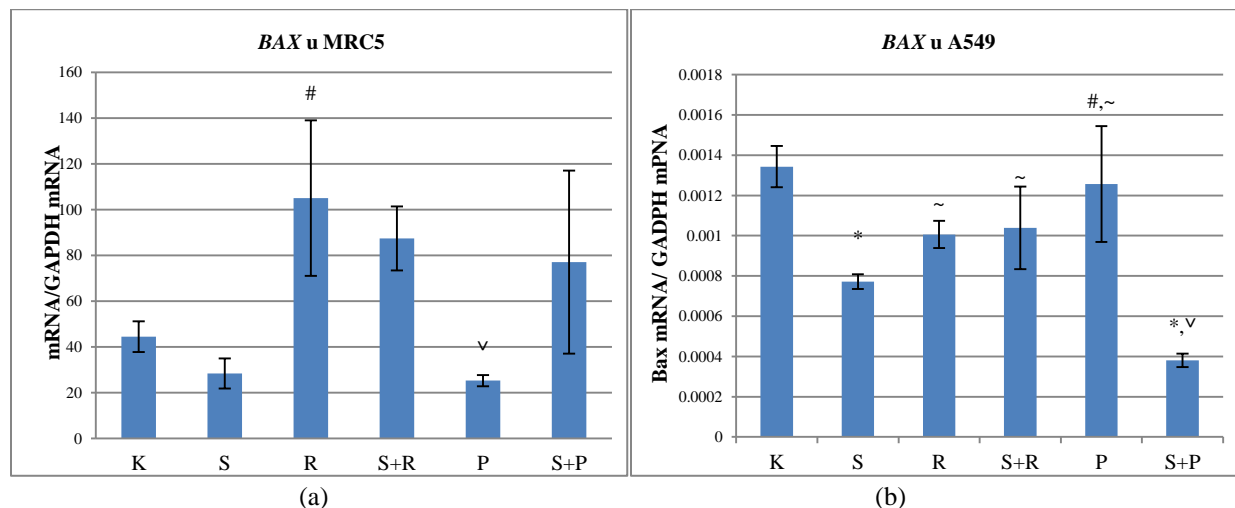
Rezultati ispitivanja relativne ekspresije gena za Bak u normalnim i malignim ćelijama, tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazan je na grafikonu 4.20.



Grafikon 4.20. Relativni nivo ekspresije mRNA za Bak u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K-kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24h). * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. S, v $p < 0,05$ vs. S+R, ~ $p < 0,05$ vs. S+P

U poređenju sa netretiranim MRC-5 ćelijama kao kontrolom, ekspresija gena za Bak se nije značajno menjala osim pri tretmanu sa kombinacijom SWCNT i resveratrola prilikom kog je došlo do povećanja ekspresije u MRC-5 ćelijama. Sličan efekat primećen je i u A549 ćelijama gde je kombinacija SWCNT i resveratrola takođe povećala ekspresiju ovog gena. Ipak, za razliku od MRC-5 ćelija, u A549 ćelijama, delovanjem SWCNT, proantocijanidola kao i kombinacije sa SWCNT statistički se značajno smanjila ekspresija gena za Bak. (grafikon 4.20)

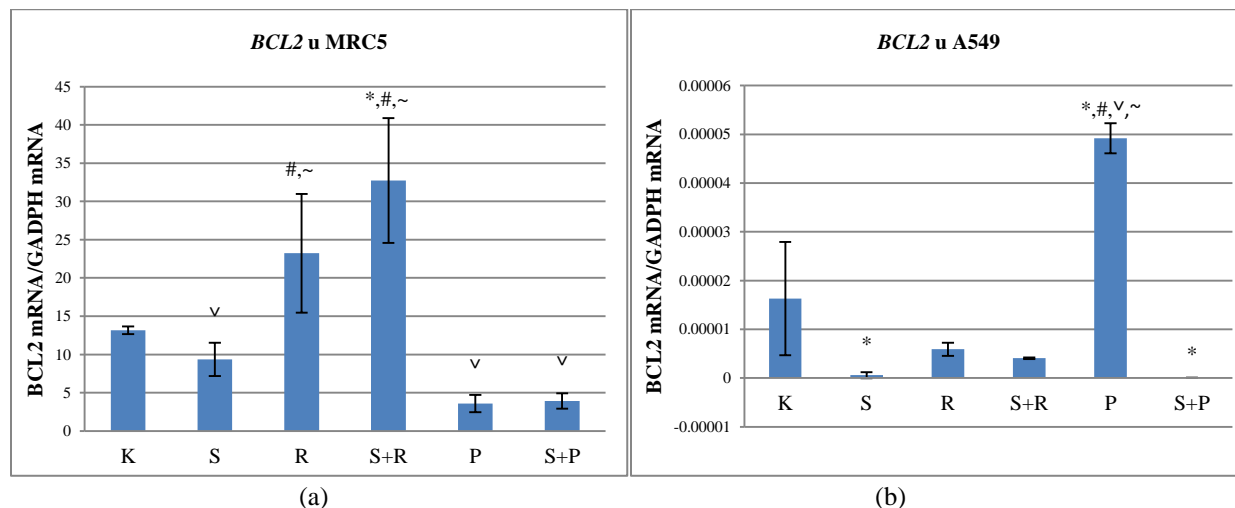
Na grafikonu 4.21. su prikazani rezultati ispitivanja relativne ekspresije gena za Bax u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima.



Grafikon 4.21. Relativni nivo ekspresije mRNK za Bax u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K-kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. S, $\vee p < 0,05$ vs. S+R, $\sim p < 0,05$ vs. S+P

Analiza ekspresije gena za Bax u MRC-5 ćelijama pokazala je da tretman ćelija sa SWCNT i proantocijanidolima smanjuje ekspresiju ovog gena, dok tretmani sa resveratrolom i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima povećava ekspresiju gena za Bax. Ipak nijedan od navedenih tretmana ne menja statistički značajno ekspresiju ovog gena u poređenju sa kontrolom. Za razliku od MRC-5 ćelija, u A549 ćelijama je smanjenja ekspresija RNK za Bax u odnosu na kontrolu nakon tretmana sa SWCNT i kombinacijom sa proantocijanidolima. (grafikon 4.21.)

Rezultati ispitivanja relativne ekspresije gena za Bcl2 u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazan je na grafikonu 4.22.

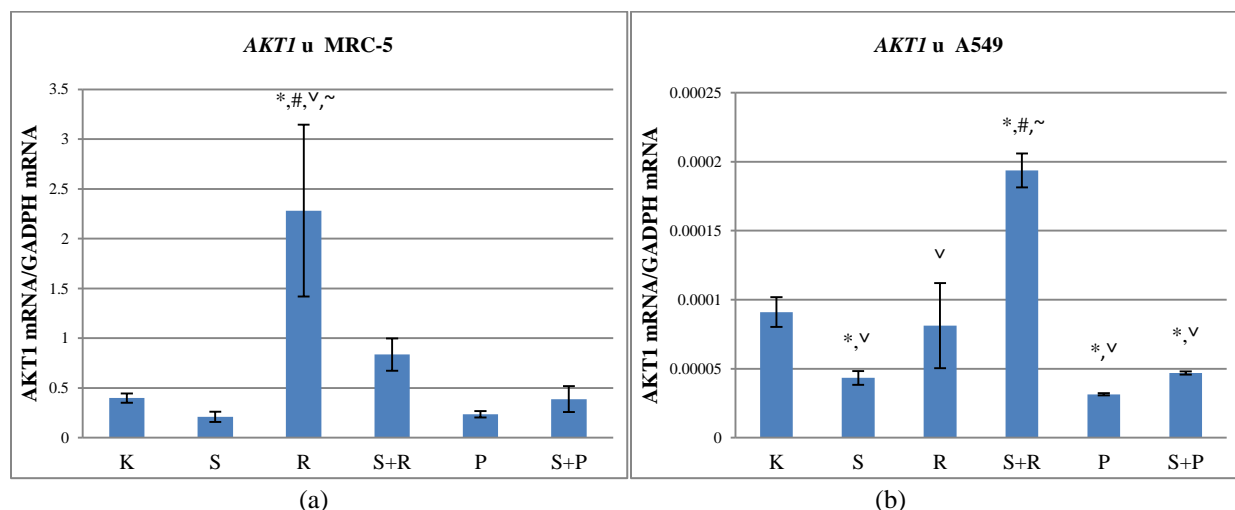


Grafikon 4.22. Relativni nivo ekspresije mRNK za Bcl2 u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K-kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. S, $\vee p < 0,05$ vs. S+R, $\sim p < 0,05$ vs. S+P

Tretman MRC-5 ćelija sa SWCNT nije doveo do statistički značajne promene ekspresije gena za Bcl2 u odnosu na netretiranu kontrolu, dok je nakon istog tretmana u A549 ćelijama smanjena ekspresija ovog gena (grafikon 4.22.). Kombinacija SWCNT i resveratrola značajno je povećala ekspresiju gena za Bcl2 u MRC-5 ćelijama. Tretman A549 ćelija kombinacijom SWCNT i proantocijanidola smanjio je ekspresiju gena za Bcl2 u poređenju sa netretiranim ćelijama.

4.5.3. Relativna ekspresija gena uključenih u regulaciju ćelijske proliferacije

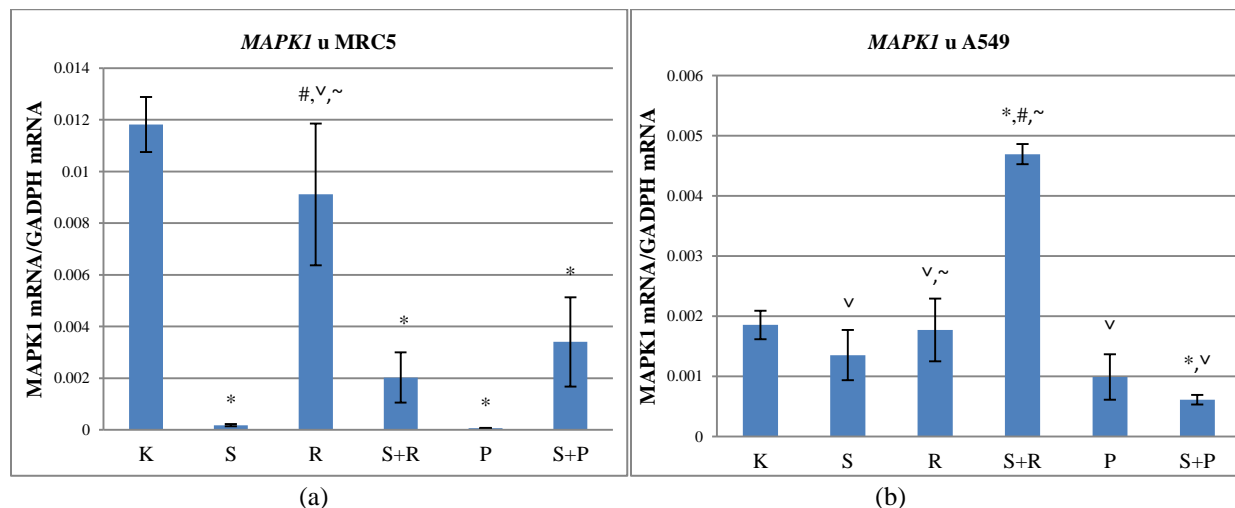
Rezultati ispitivanja relativne ekspresije gena za AKT u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazan je na grafikonu 4.23.



Grafikon 4.23. Relativni nivo ekspresije mRNK za AKT1 u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K-kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). *p<0,05 vs. K, #p<0,05 vs. S, v p<0,05 vs. S+R, ~p<0,05 vs. S+P

U MRC-5 ćelijama jedino je tretman resveratrolom značajno povećao ekspresiju gena za AKT1. Analiza ekspresije ovog gena u A549 ćelijama pokazala je da je nakon tretmana sa SWCNT, proantocijanidolima i kombinacijom proantocijanidola sa SWCNT došlo do smanjenja ekspresije gena za AKT1. Zanimljivo je da je kombinacija SWCNT sa resveratrolom značajno povećala ekspresiju gena za AKT1 u odnosu na netretirane i SWCNT tretirane A549 ćelije. (grafikon 4.23.)

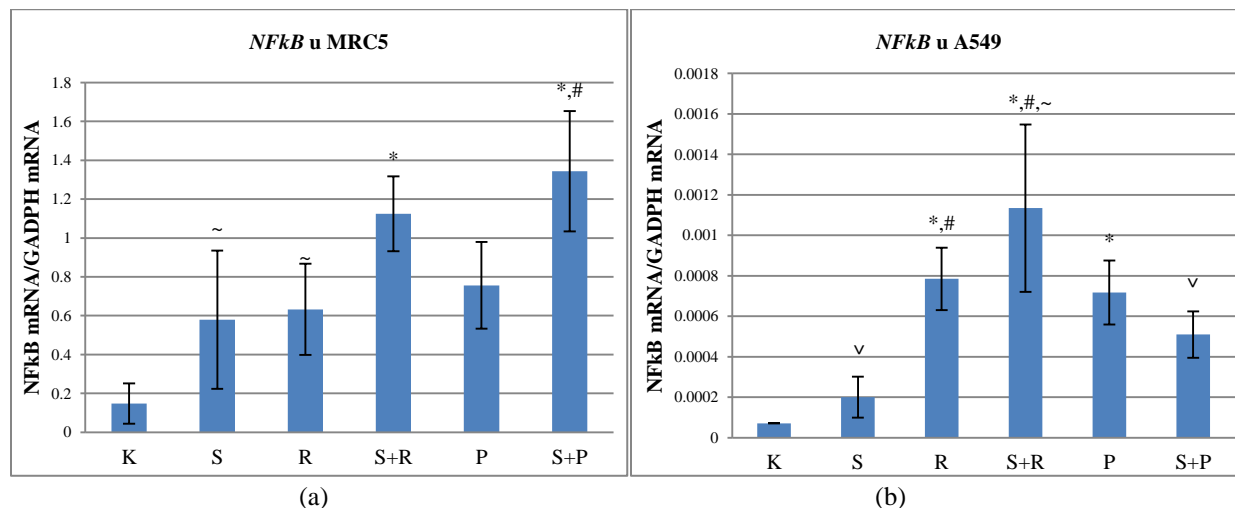
Na grafikonu 4.24. su prikazani rezultati ispitivanja relativne ekspresije gena za MAPK1 u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima.



Grafikon 4.24. Relativni nivo ekspresije mRNK za MAPK1 u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K-kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. S, $v p < 0,05$ vs. S+R, $\sim p < 0,05$ vs. S+P

Analiza ekspresije gena za MAPK1 u MRC-5 ćelijama je pokazala da je tretman sa SWCNT i proantocijanidolima značajno smanjio nivo ekspresije gena za MAPK1 u poređenju sa kontrolom. P vrednosti bile su $4,9 \times 10^{-6}$, odnosno $4,45 \times 10^{-6}$ retrospektivno. Slični efekti uočeni su i nakon tretmana sa SWCNT u kombinaciji sa oba antioksidanta. Za razliku od MRC-5 ćelija, tretman A549 ćelija sa SWCNT nije doveo do značajnije promene u ekspresiji gena za MAPK1 dok se delovanjem SWCNT u kombinaciji sa antioksidantima statistički značajno povećala (S+R) odnosno smanjila (S+P) ekspresija ovog gena. (grafikon 4.24.)

Rezultati ispitivanja relativne ekspresije NFkB gena u normalnim i malignim ćelijama, tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazan je na grafikonu 4.25.



Grafikon 4.25. Relativni nivo ekspresije mRNK za NFkB u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K-kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). *p<0,05 vs. K, #p<0,05 vs. S, v p<0,05 vs. S+R, ~p<0,05 vs. S+P

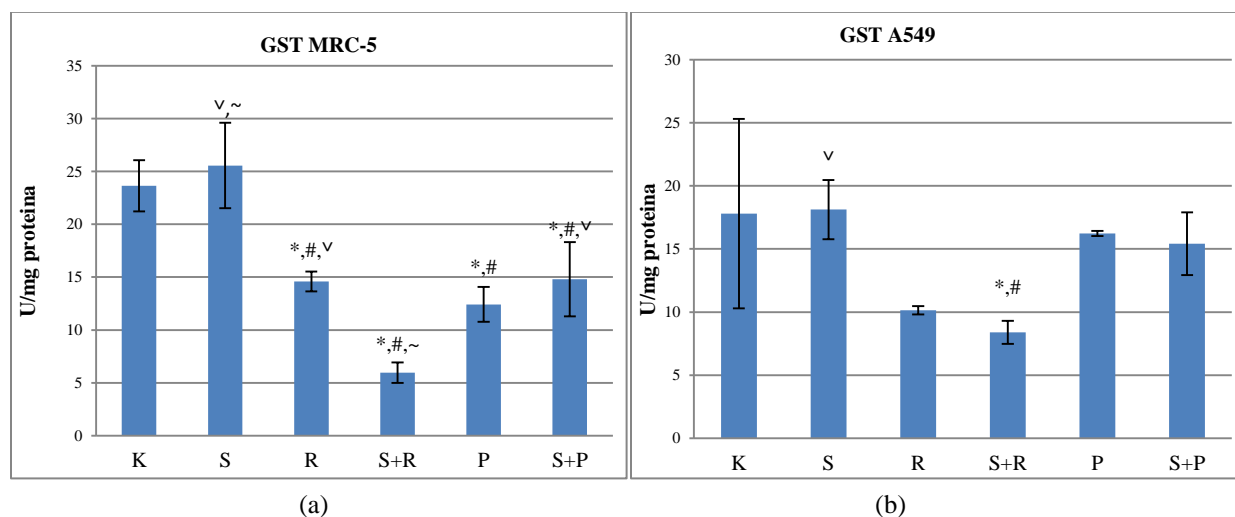
Nivo ekspresije gena za NFkB u MRC-5 ćelijama je, u odnosu na kontrolu, veći za sve primenjene vrste tretmana, a značajno je veći prilikom primene kombinovanih tretmana (S+R; S+P). U A549 ćelijama resveratrol sam ili u kombinaciji sa SWCNT povećao je ekspresiju gena za NFkB u odnosu na kontrolne vrednosti. Nakon delovanja proantocijanidola uočen se sličan trend povećanja genske ekspresije (grafikon 4.25.).

4.6. Rezultati delovanja SWCNT i antioksidanata na specifičnu aktivnost enzima antioksidativne zaštite

U cilju određivanja delovanja SWCNT, pojedinačno i u kombinaciji sa antioksidantima, na specifičnu aktivnost odabranih enzima, MRC-5 i A549 ćelije su tokom 24h tretirane navedenim supstancama pojedinačno (100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT; 50 $\mu\text{g/mL}$ resveratrola; 10 $\mu\text{L/mL}$ proantocijanidola) ili kombinacijom 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT + 50 $\mu\text{g/mL}$ resveratrola odnosno 10 $\mu\text{L/mL}$ proantocijanidola.

4.6.1. Specifična aktivnost glutacion S-transferaze

Rezultati ispitivanja aktivnosti glutacion S-transferaze u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazani su na grafikonu 4.26.



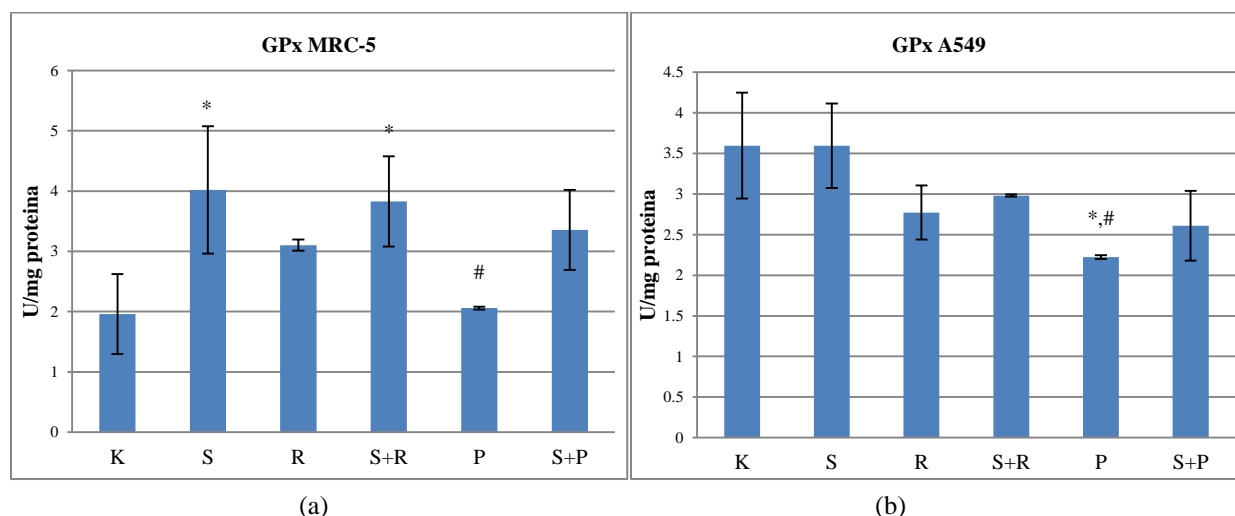
Grafikon 4.26. Specifična aktivnost glutacion S-transferaze (GST) u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K- kontrola; S- 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT, 24 h; R- 50 $\mu\text{g/mL}$ resveratrola, 24 h; S+R- 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT + 50 $\mu\text{g/mL}$ R, 24 h; P- 10 $\mu\text{g/mL}$ proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT + 10 $\mu\text{g/mL}$ P, 24 h). * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. S, ^ $p < 0,05$ vs. S+R, ~ $p < 0,05$ vs. S+P

Analizom rezultata zaključuje se da u MRC-5 ćelijskoj liniji tretman sa SWCNT ne menja značajno specifičnu aktivnost glutacion S-transferaze, dok u ćelijama tretiranim antioksidantima pojedinačno, ili u kombinaciji sa SWCNT statistički značajno se smanjila aktivnost GST u odnosu na kontrolu. U A549 ćelijama tretman kombinacijom resveratrola sa SWCNT smanjio je specifičnu aktivnost u poređenju sa kontrolom, ali i u odnosu na tretman

samo sa SWCNT. Tretman A549 ćelija sa resveratrolo smanjio je specifičnu aktivnost glutathion S-transferaze, iako ovo smanjenje nije bilo statistički značajno.

4.6.2. Specifična aktivnost glutathion peroksidaze

Rezultati ispitivanja specifične aktivnosti glutathion peroksidaze u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazan je na grafikonu 4.27.

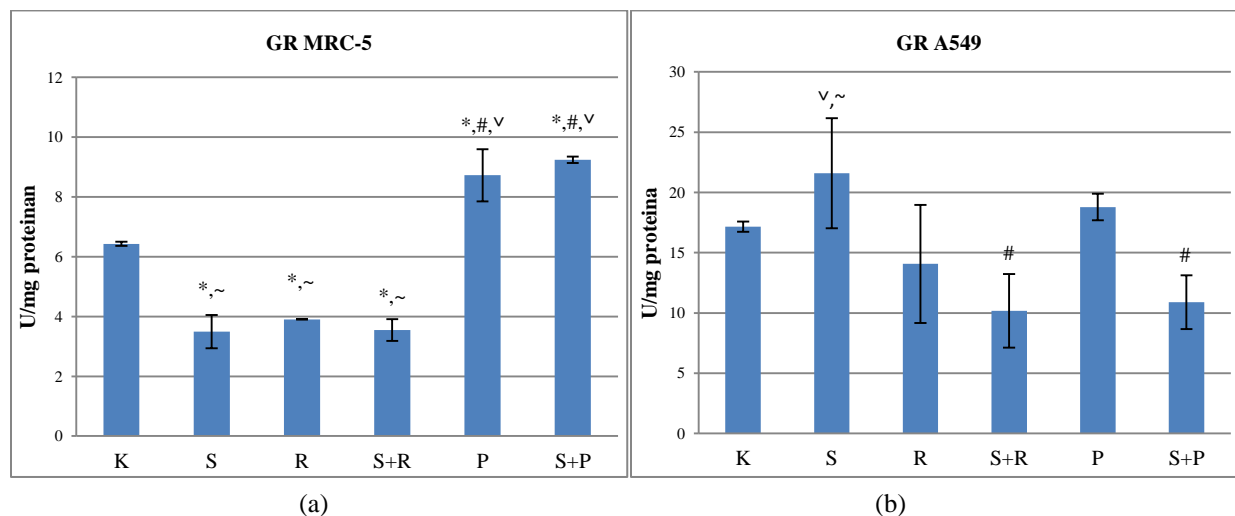


Grafikon 4.27. Specifična aktivnost glutathion peroksidaze (GPx) u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K- kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. S, ~ $p < 0,05$ vs. S+R, ~ $p < 0,05$ vs. S+P

Tretman MRC-5 ćelija sa SWCNT pojedinačno i u kombinaciji sa resveratrolo doveo je do povećanja aktivnosti glutathion peroksidaze u poređenju sa kontrolom. Isti tretmani u A549 ćelijama nisu značajno uticali na specifičnu aktivnosti GPx. U poređenju sa kontrolom, tretman sa proantocijanidolima značajno je smanjio aktivnosti GPx u A549 ćelijama dok je u MRC-5 ćelijama specifična aktivnost ovog enzima bila u granicama kontrolnih vrednosti. (grafikon 4.27.)

4.6.3. Specifična aktivnost glutation reduktaze

Specifična aktivnosti glutation reduktaze u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazani su na grafikonu 4.28.

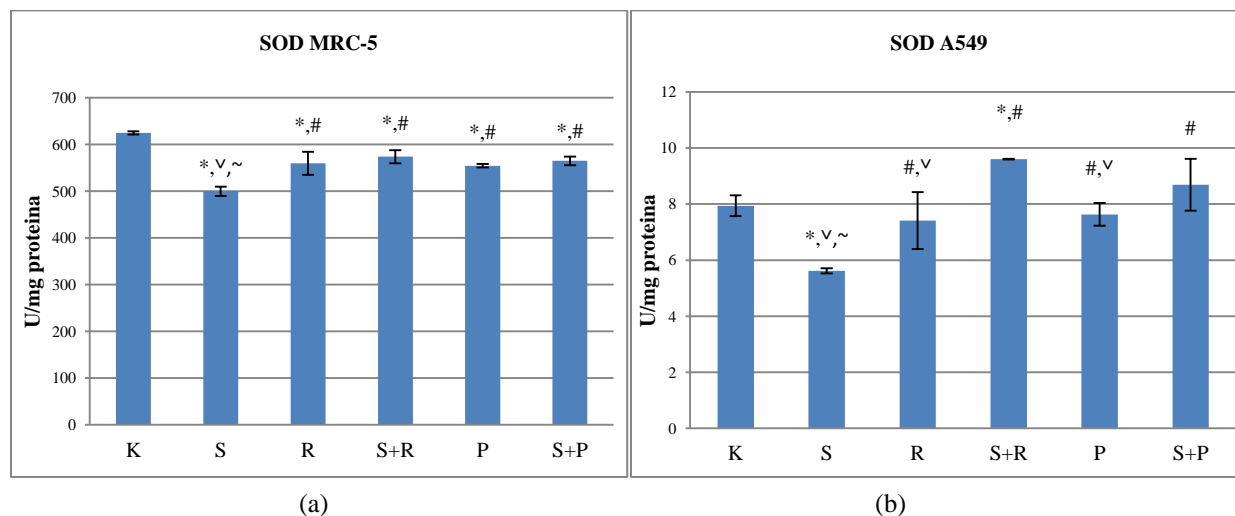


Grafikon 4.28. Specifična aktivnost glutation reduktaze (GR) u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K-kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. S, $\vee p < 0,05$ vs. S+R, $\sim p < 0,05$ vs. S+P

Za razliku od A549 ćelijske linije gde nijedan od navedenih tretmana nije doveo do značajne promene aktivnosti glutation reduktaze u odnosu na kontrolu, u MRC-5 ćelijama tretman sa SWCNT, resveratrolom kao i kombinacijom SWCNT sa resveratrolom smanjio je specifičnu aktivnost GR. U MRC-5 ćelijama tretman sa proantocijanidolima pojedinačno, kao i u kombinaciji sa SWCNT statistički je značajno povećao specifičnu aktivnosti GR.

4.6.4. Specifična aktivnost superoksid dismutaze

Rezultati ispitivanja specifične aktivnosti superoksid dismutaze u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazani su na grafikon 4.29.



Grafikon 4.29. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K- kontrola; S- 100 µg/mL SWCNT, 24 h; R- 50 µg/mL resveratrola, 24 h; S+R- 100 µg/mL SWCNT + 50 µg/mL R, 24 h; P- 10 µg/mL proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 µg/mL SWCNT + 10 µg/mL P, 24 h). * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. S, $v p < 0,05$ vs. S+R, $\sim p < 0,05$ vs. S+P

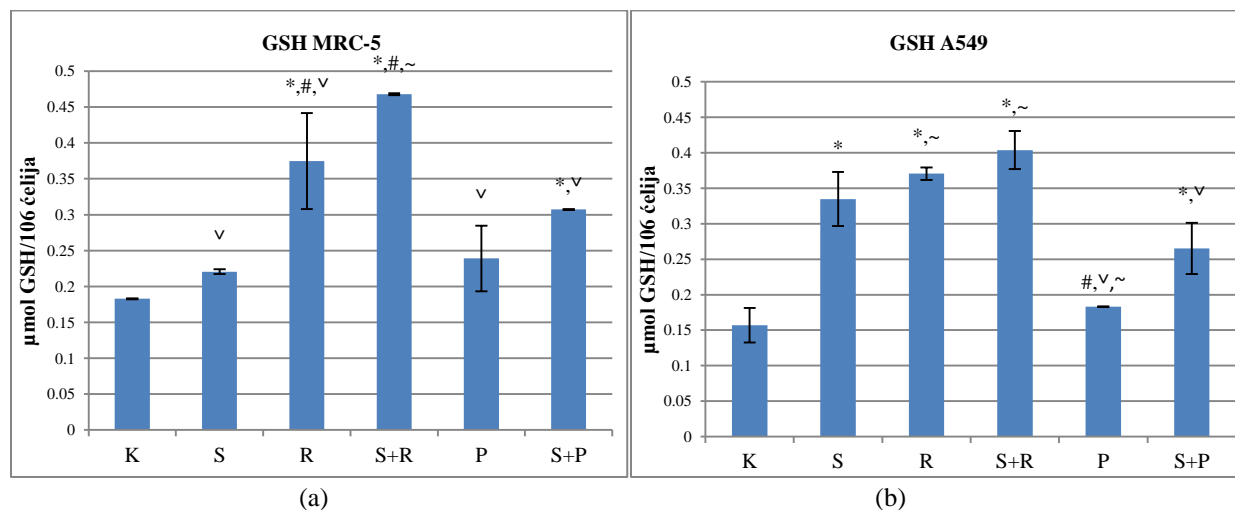
Rezultati su pokazali da je tretman sa SWCNT doveo do značajnog smanjenja specifične aktivnosti superoksid dismutaze u obe ćelijske linije u poređenju sa netretiranim ćelijama. U MRC-5 ćelijama osim SWCNT, tretmani sa antioksidantima kao i kombinacijama antioksidanata sa SWCNT su doveli do smanjenja specifične aktivnosti SOD. U A549 ćelijama samo je tretman kombinacijom SWCNT sa resveratrolom značajno povećavao specifičnu aktivnost SOD.

4.6.5. Specifična aktivnost katalaze

Rezultati ispitivanja specifične aktivnosti katalaze u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima su pokazali da se aktivnost katalaze ni u kontrolnim ni u tretiranim A549 i MRC-5 ćelijskim linijama nije mogla detektovati.

4.6.6. Količina glutationa

Rezultati ispitivanja količine ukupnog glutationa u normalnim i malignim ćelijama tretiranim sa SWCNT, antioksidantima i kombinacijom SWCNT sa antioksidantima prikazani su na grafikonu 4.30.



Grafikon 4.30. Količina glutationa (GSH) u (a) MRC-5 i (b) A549 ćelijskim linijama (K- kontrola; S- 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT, 24 h; R- 50 $\mu\text{g/mL}$ resveratrola, 24 h; S+R- 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT + 50 $\mu\text{g/mL}$ R, 24 h; P- 10 $\mu\text{g/mL}$ proantocijanidola, 24 h; S+P- 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT + 10 $\mu\text{g/mL}$ P, 24 h). * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. S, v $p < 0,05$ vs. S+R, ~ $p < 0,05$ vs. S+P

Delovanje SWCNT dovelo je do značajnog povećanja količine glutationa u odnosu na kontrolu samo u A549 ćelijskoj liniji. U MRC-5 ćelijama tretman sa resveratrolom pojedinačno, kao i u kombinacijom sa SWCNT povećao je količinu glutationa. Isti rezultat je dobijen i delovanjem kombinacije proantocijanidola sa SWCNT. U A549 ćelijama, u odnosu na netretirane ćelije, pojedinačni tretmani sa SWCNT i resveratrolom, kao i kombinacije SWCNT sa antioksidantima doveli su do povećanja ukupne količine glutationa.

5. DISKUSIJA

U ovom istraživanju ispitivan je biološki odgovor dve humane ćelijske linije, normalnih fibroblasta pluća, MRC-5, i adenokarcinoma pluća, A549, na tretman sa SWCNT pojedinačno i u kombinaciji sa antioksidantima. U okviru biološkog odgovora praćeno je preživljavanje ćelija (vijabilnost ćelija), procentualna zastupljenost ćelija u subG1, G0/G1, S i G2/M fazama ćelijskog ciklusa, promena ekspresije gena uključenih u procese apoptoze, regulaciju ćelijske proliferacije, kao i gena čiji su produkti uključeni u antioksidativnu zaštitu i sintezu glutaciona. Istraživanje je obuhvatilo i ispitivanje uticaja SWCNT i antioksidanata na aktivnost enzima antioksidativne zaštite. Ćelije su analizirane i transmissionim elektronskim mikroskopom sa ciljem da se ispita da li dolazi do interakcije odnosno ulaska SWCNT u ćelije, i da li ulaskom SWCNT u ćeliju nastaju ultrastrukturne promene u ćelijskoj morfologiji.

Vijabilnost ćelija tretiranih sa SWCNT i antioksidantima, pojedinačno i u kombinacijama ispitana je standardnim kolorimetrijskim testom koji koristi tetrazolijum so MTT. Ovim testom se procenjuje metabolička aktivnost ćelija, odnosno aktivnost mitohondrijalne sukcinat dehidrogenaze da redukuje MTT u nerastvorljivi formazan. U cilju određivanja antiproliferativnog efekta SWCNT, resveratrola, N-acetil cisteina i proantocijanidola pojedinačno, kao i kombinacija SWCNT sa navedenim antioksidantima, MRC-5 i A549 ćelije tretirane su tokom dva eksperimentalna vremena (24h i 48h) sa svakom ispitivanom supstancom u rasponu od pet rastućih koncentracija. Kombinacija SWCNT i antioksidanata podrazumevala je tretman fiksnom koncentracijom SWCNT sa po pet rastućih koncentracija svakog antioksidanta.

Brojna su istraživanja koja ukazuju na citotoksičnost ugljeničnih nanocevi, ali istovremeno ukazuju i da odgovor različitih ćelija na istu koncentraciju ugljeničnih nanocevi ne mora biti istovetan. [74, 75]. Rezultati naših eksperimenata pokazali su da je citotoksičnost SWCNT prema ispitivanim ćelijskim linijama umerena, jer čak i nakon tretmana sa visokim koncentracijama SWCNT (>500 µg/mL) nije došlo do inhibicije rasta ćelija u kulturi za 50%, odnosno nisu postignute IC50 vrednosti. Takođe, osim umerene citotoksičnosti, primećuje se i da antiproliferativni efekat nije isti za obe ćelijske linije, već da zavisi od tipa ćelije. Posmatrajući trend preživljavanja MRC-5 i A549 ćelija nakon tretmana sa 100 µg/ml tokom 24 h može se zapaziti da se kod A549 ćelija, za razliku od zdrave ćelijske linije, vijabilnost smanjuje za oko tri puta više. Naime, ista koncentracija SWCNT indukuje tri puta veću citotoksičnost u A549

ćelijama (27,88%) nego u MRC-5 ćelijama (9,41%) što upućuje na zaključak da su maligne ćelije osetljivije na delovanje SWCNT.

Imajući u vidu razliku u citotoksičnom odgovoru dve ćelijske linije nakon tretmana sa 100 µg/mL tokom 24h, kao i da tretman visokim koncentracijama (>250 µg/mL) SWCNT nije pokazivao značajna odstupanja u antiproliferativnom odgovoru u dve ispitivane ćelijske linije tokom oba perioda inkubacije, ispitivanja ćelijskog ciklusa, promene genske ekspresije, specifične aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, kao i TEM analiza rađene su sa koncentracijom od 100 µg/mL SWCNT i u eksperimentalnom vremenu od 24h.

Podaci iz literature o mogućim mehanizmima citotoksičnog delovanja SWCNT ukazuju na nekoliko različitih mogućnosti, poput oksidativnog stresa, rupture ćelijske membrane i ometanja intracelularnih metaboličkih puteva. Ipak nanočesticama indukovani oksidativni stres, bilo kao posledica intrinzičkih karakteristika nanočestica ili ekstrinzičke interakcije između nanočestice i same ćelije, deluje kao najverovatniji uzrok citotoksičnosti. Shvedova i sar. testirali su efekte SWCNT na humanim epidermalnim keratinocitima nakon 18h ekspozicije i opisali gubitak ćelijske vijabilnosti kao posledicu oksidativnog stresa [59]. U eksperimentima Kagan i sar. pokazano je da tretman makrofaga miša sa SWCNT dovodi do značajnog gubitka intracelularnih niskomolekularnih tiola (GSH), kao i do akumulacije lipidnih peroksida [76]. Ipak, dosadašnja saznanja o mehanizmima citotoksičnosti ugljeničnih nanocevi kao i otkrića o enzimskoj biodegradaciji ugljeničnih nanomaterijala peroksidazama ukazuje da oksidativni stres ne mora biti glavni mehanizam odgovoran za toksične efekte nanočestica [77]. Pokazano je da osim povećanja koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta i njihovog direktnog oštećenja ćelije, reaktivne kiseonične vrste učestvuju u ćelijskim signalnim putevima i da mogu indukovati apoptozu kao i zaustavljanje ćelijskog ciklusa. Upravo je istraživanje Cui i sar. na humanim embrionalnim ćelijama bubrega (HEK293) ukazalo na povezanost antiproliferativnog efekta SWCNT i apoptoze [78].

Povećana osetljivost malignih A549 u odnosu na zdrave MRC-5 ćelije koja je uočena tokom istraživanja može ukazati na disbalans antioksidativnog statusa u malignim ćelijama, u uslovima pro-oksidativne aktivnosti SWCNT. Brojni literaturni podaci ukazuju da je u poređenju sa zdravim ćelijama produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta u malignim ćelijama povećana, iako se tačan uzrok ovog povećanja još uvek ne zna. Poznato je da nivo oksidativnog stresa zavisi od

dinamične ravnoteže između produkcije i eliminacije ROS molekula. Jedan od predloženih mehanizama povećane produkcije ROS molekula u malignim ćelijama jeste onkogen c-Myc, regulatorni gen, koji kodira sintezu transkripcionih faktora koji povećavaju sintezu ROS molekula [79]. Drugi mogući mehanizam povećane produkcije ROS molekula u malignim ćelijama može biti posledica disfunkcije mitohondrijalnog respiratorog lanca, koji je glavni izvor ovih molekula. U uslovima povećanog oksidativnog stresa koji karakteriše maligne ćelije, tretman sa SWCNT čija je citotoksičnost povezana sa povećanom produkcijom molekula ROS mogao bi da uslovi stvaranje visokih koncentracija ovih molekula u samoj ćeliji. Odnosno, tretmanom malignih ćelija sa SWCNT indukovala bi se toliko velika količina ROS molekula, koja bi iscrpela adaptivne mehanizme ćelije i izazvala ireverzibilna oštećenja ćelije i njenu smrt.

Da bi se utvrdila uloga oksidativnog stresa u citotoksičnom delovanju ugljeničnih nanocevi, kao i uloga različitih antioksidanata, SWCNT su kombinovane sa poznatim antioksidantima; N-acetil cisteinom, resveratrolom i proantocijanidolima.

Tretman MRC-5 ćelija kombinacijom 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT sa tri izabrana antioksidanta pokazao je da niske koncentracije resveratrola i N-acetil cisteina, (25 $\mu\text{g/mL}$ resveratrola, odnosno 1,5 $\mu\text{g/mL}$ N-acetil cisteina) nemaju protektivni efekat na MRC-5 ćelije, već da tokom 24h blago povećavaju citotoksičnost u poređenju sa 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT. Najniža ispitivana koncentracija proantocijanidola (5 $\mu\text{g/mL}$) u kombinaciji sa SWCNT, ne samo da nije imala protektivni efekat, već je procenat citotoksičnosti bio dva puta veći nego procenat indukovani samostalnim tretmanom sa SWCNT. Daljim povećanjem koncentracije antioksidanata u kombinaciji sa SWCNT primećeno je dozno zavisno povećanje citotoksičnosti za svaku ispitivanu kombinaciju. Za razliku od MRC-5, odgovor A549 ćelijske linije pokazao je drugačiji odgovor pri tretmanu sa 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT i rastućim koncentracijama tri ispitivana antioksidanta. Niske koncentracije sva tri antioksidanta u kombinaciji sa 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT smanjivale su citotoksičnost u odnosu na vrednost dobijenu sa 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT, a ovaj efekat je najizraženiji u kombinaciji SWCNT sa proantocijanidolima. Kombinacija 100 $\mu\text{g/mL}$ sa 5, odnosno 10 $\mu\text{g/mL}$ proantocijanidola tokom perioda inkubacije od 24h pokazala je citotoksični odgovor koji je dva do tri puta manji od citotoksičnog efekta tretmana sa 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT. Protektivni efekat sva tri ispitivana antioksidanta u kombinaciji sa SWCNT gubio se pri visokim

koncentracijama, i pokazivao snažan antiproliferativni efekat za oba ispitivana perioda inkubacije.

Razlike u odgovoru između MRC-5 i A549 ćelija prilikom tretmana sa kombinacijama SWCNT sa antioksidantima mogu se objasniti razlikom u nivou oksidativnog stresa. Zbog činjenice da maligne ćelije proizvode veliku količinu ROS molekula i da su izložene povećanom nivou oksidativnog stresa u odnosu na normalne ćelije, pretpostavlja se da su ujedno i više zavisne od prisustva antioksidanata u pokušaju da se izbore sa oksidativnim stresom. Moguće je da resveratrol i proantocijanidoli kao prirodni polifenoli poznati po svojoj sposobnosti da hvataju slobodne radikale, i N-acetil cistein kao prekursor glutationa stupaju u interakciju sa SWCNT ili drugim ćelijskim komponentama i na taj način moduliraju oksidativni stres i njime uslovljena oštećenja.

Ugljenične nanocevi mogu sadržati velike količine rezidualnih metalnih nečistoća (1-10%) koje mogu delimično biti odgovorne za njihove toksične efekte [80]. U ovoj studiji korišćene su jednoslojne ugljenične nanocevi stepena čistoće od 50-70% koje su sadržale gvožđe kao rezidualni metal tokom procesa proizvodnje. Gvožđe zbog svojih odličnih redoks karakteristika predstavlja esencijalni element važan za mnoge katalitičke i transportne uloge u ćeliji. Na primer, u prisustvu gvožđa povećava se aktivnost mitohondrijalne akonitaze, kao i nekoliko enzima Krevsovog ciklusa. Na taj način gvožđe povećava mitohondrijalnu potrošnju kiseonika i formiranje ATP-a putem oksidativne fosforilacije. Sa druge strane upravo redoks potencijal gvožđa, ali i drugih redoks metala može izazvati redukciju molekula kiseonika i usloviti nastanak superoksid anjona, singlet kiseonika, vodonik peroksida, lipidnih peroksida kao i hidroksil radikala. U radu Kagan i sar. pokazano je da neprečišćene ugljenične nanotube sa visokim sadržajem gvožđa izazivaju prekomerno stvaranje ROS molekula i oksidativni stres kod makrofaga [76]. Danas su razvijene brojne metode kojima je moguće prečistiti ugljenične nanocevi, poput hemijskih, fizičkih ili hromatografskih tehnika [81, 82]. Međutim, uprkos razvoju ovih metoda, izvesna količina metalnih onečišćenja ipak zaostaje zaštićena unutar cilindra nanocevi, jer bi primena agresivnih i komplikovanih načina prečišćavanja mogla dovesti do oštećenja strukture nanocevi [83]. Jednoslojne ugljenične nanocevi koje su korišćene u našem eksperimentu, imale su umerenu citotoksičnost iako su sadržavale nečistoće zaostale tokom procesa proizvodnje. Uz prisutne nečistoće čak i nakon tretmana sa visokim dozama (>500

µg/mL) nije postignuta inhibicija rasta ćelija u kulturi za 50% u odnosu na netretirane ćelije kontrolne grupe.

U cilju što preciznijeg sagledavanja citotoksičnog delovanja SWCNT važno je napomenuti da se pregledom literature mogu pronaći podaci koji ukazuju na interakciju nanomaterijala poput ugljeničnih nanocevi i testova vijabilnosti. U radu Wörle-Knirsch i sar. ukazano je na mogućnost interakcije SWCNT sa MTT-formazan kristalima [84]. Nakon vezivanja SWCNT za MTT-formazan dolazi do stabilizacije hemijske strukture, što ima za posledicu nemogućnost rastvaranja kristala u 2-propanol/HCL ili acetonu i direktan uticaj na rezultate, zbog čega autori ukazuju na potrebu za izvođenjem dodatnih testova citotoksičnosti u kontekstu verifikacije rezultata. Da bi se izbegla potencijalna interakcija između SWCNT i MTT boje u našem eksperimentu ćelije su nakon tretmana sa SWCNT isprane rastvorom PBS-a pre dodavanja MTT.

Nakon utvrđivanja citotoksičnog delovanja SWCNT i antioksidanata na ćelijski rast i preživljavanje MRC-5 i A549 ćelija, u cilju utvrđivanja mehanizma citotoksičnosti, uz pomoć protočne citometrije ispitano je prisustvo apoptoze i nekroze. Jedan od prvih znakova apoptoze jeste translokacija membranskog fosfolipida, fosfatidil serina sa unutrašnje na spoljašnju stranu membrane, pri čemu se detekcija apoptotskih ćelija zasniva na afinitetu Annexin V proteina prema fosfatidil serinu. Ovaj proces translokacije fosfolipida prethodi gubitku integriteta ćelijske membrane i ćelijskoj smrti koja može biti detektovana uz pomoć propidijum jod boje. Suštinski, annexin V pozitivne ćelije reprezentuju ranu apoptozu, dok ćelije koje su annexin V i propidijum jod pozitivne predstavljaju kasnu apoptozu ili nekrozu.

Prema rezultatima ispitivanja apoptoze pomoću protočne citometrije, za obe ispitivane ćelijske linije najaktivniji su bili tretmani sa proantocijanidolima, odnosno kombinacija SWCNT sa proantocijanidolima nakon eksperimentalnog vremena od 24h. Tretman sa 100 µg/ml SWCNT u A549 ćelijskoj liniji gotovo da nije imao uticaja na indukciju apoptoze, dok je u MRC-5 ćelijama ovaj efekat svega 1,5%. Rezultati ispitivanja nekroze pokazali su da je tretman MRC-5 ćelija sa SWCNT indukovao nekrozu u niskom procentu (oko 3%), a sličan odgovor primećen je i u A549 liniji. Visok procenat nekrotičnih ćelija u obe ispitivane ćelijske linije dobijen je nakon tretmana kombinacijom proantocijanidola i SWCNT.

U literaturi se mogu pronaći rezultati koji ukazuju da SWCNT indukuju ćelijsku smrt putem apoptoze, a neslaganje u dobijenim rezultatima moguće je tražiti u karakteristikama ispitivanih ugljeničnih nanocevi, (dužina, dijametar, stepen čistoće, metalne rezidue itd.), dužini ekspozicije, koncentraciji SWCNT, ali i razlikama u odgovoru različitih ćelija na tretman sa SWCNT. Takođe, u radu Park i sar. opisano je smanjenje vijabilnost ćelija bronhijalnog epitela nakon tretmana sa SWCNT, a kao mehanizam citotoksičnog delovanja navodi se oštećenje mitohondrija i indukcija autofagije [85]. Liu i sar., su pokazali da je delovanje SWCNT povezano sa procesom autofagije, odnosno formiranjem autofagozoma i ushodnom regulacijom LC3-II kao markera autofagije u A549 ćelijama nakon tretmana sa funkcionalizovanim SWCNT [86].

Važno je napomenuti i da se citotoksično delovanje ugljeničnih nanocevi događa i u odsustvu oksidativnog stresa i apoptoze, što ukazuje na alternativne, ne-oksidativnim stresom indukovane mehanizme toksičnog delovanja ugljeničnih nanocevi [87]. Potencijalni alternativni mehanizam citotoksičnosti podrazumeva fizičku interakciju ugljeničnih nanocevi sa celularnim i ekstracelularnim elementima uz posledično ometanje vitalnih ćelijskih procesa i ćelijsku smrt. Primer ovakve fizičke interakcije navode Holt i sar. koji su ukazali da usled intracelularnog prisustva SWCNT dolazi do povezivanja aktinskih filamenata u snopove što je praćeno snažnim antiproliferativnim efektom [88].

U cilju boljeg razumevanja citotoksičnog delovanja ugljeničnih nanocevi, kao i sagledavanja potencijalnih interakcija i lokalizacije jednoslojnih ugljeničnih nanocevi, MRC-5 i A549 ćelije su analizirane transmisionim elektronskim mikroskopom. TEM analiza pokazala je da su SWCNT prisutne u ćeliji, najčešće u vezikulama, i da se u njima nalaze ili pojedinačno ili češće kao snopovi usled agregacije većeg broja pojedinačnih nanocevi. Upravo tendencija pojedinačnih nanocevi ka agregaciji kao posledica van der Waals-ovih sila i velike hidrofobnosti ovog nanomaterijala predstavlja jedan od vodećih problema u proceni citotoksičnosti. Agregacijom ugljeničnih nanocevi menja se zapravo njihova površina dostupna za interakciju sa ćelijom, čime se menja i biološki odgovor. Važno je napomenuti i uticaj prisutnih nečistoća na agregaciju nanocevi. Naime, prisutne nečistoće koje zaostaju tokom procesa proizvodnje utiču na tendenciju nanocevi ka agregaciji, čime se menja i njihov toksikološki profil [61].

Osim agregata SWCNT koji su primećeni intracelularno, unutar vezikula, uočeni su i agregati SWCNT cilindrične strukture, koji pod pravim uglom ili ređe pod oštrim uglom prolaze kroz ćelijsku membranu. Objašnjenje za ovakvu interakciju sa ćelijskom membranom može se naći u fizičko-hemijskim karakteristikama ugljeničnih nanocevi. Zbog svoje hidrofobnosti i odsustva bočnih lanaca, verovatno je da se SWCNT privučene hidrofobnim vezama zabadaju u ćelijsku membranu, a ovakva interakcija sa membranom može uticati na funkciju brojnih membranskih receptora.

Tačni mehanizmi ulaska SWCNT u ćelije još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Postoje podaci o ulasku SWCNT u ćeliju putem endocitoze ili difuzijom kroz lipidni dvosloj ćelijske membrane [89, 60] Porter i sar. su analizirali elektronskim mikroskopom ćelije koje su tokom 48h odnosno 96h bile tretirane sa SWCNT i ukazali na prisustvo SWCNT unutar fagozoma i lizozoma. Dobijeni rezultati sugerišu na fagocitozu-proces tokom kojeg dolazi do ingestije ćelijskih fragmenata ili mikropartikula. U istom radu navodi se da su SWCNT translocirane kroz ćelijsku membranu ukazujući i na pasivnu difuziju kao jedan od načina ulaska SWCNT u ćeliju [90]. Posebno su zanimljivi rezultati Shinde i sar. koji ukazuju na mogućnost ugljeničnih nanocevi da zabadanjem u ćelijsku membranu postignu konfiguraciju transmembranskog proteina (npr. u obliku kanala) koji su sposobni za razmenu ćelijskog sadržaja. Autori navode da delovanjem van der Waals-ovih sila ugljenične nanotube mogu ekstrahovati velike količine fosfolipida prisutnih u ćelijskoj membrani [61].

Naši rezultati dobijeni TEM analizom u saglasnosti su sa brojnim radovima koji ukazuju da ugljenične nanocevi ulaze u ćeliju, kao i da stupaju u interakciju sa ćelijskim membranama. TEM analizom obe ispitivane ćelijske linije koje su tretirane kombinacijom SWCNT sa resveratrolom uočene su apoptotske ćelije, što se uklapa u naše rezultate određivanja apoptoze protočnom citometrijom.

Literaturni podaci o uticaju jednoslojnih ugljeničnih nanocevi na regulaciju genske ekspresije dosta su oskudni, što je i razumljivo imajući u vidu relativno skorije otkriće ugljeničnih nanocevi i kratku istoriju primene ovog nanomaterijala. Zbog upotrebe različitih ćelijskih linija, ugljeničnih nanocevi različitih karakteristika i stepena čistoće, drugačijih eksperimentalnih uslova podaci o delovanju ovog nanomaterijala često su i kontradiktorni.

Pogotovo je slabo ispitan uticaj SWCNT u kombinaciji sa antioksidantima na profil genske ekspresije, što je bio jedan od ciljeva našeg eksperimenta.

Ekspresija proteina u signalnim putevima preživljavanja, apoptoze, antioksidativne zaštite i sinteze glutationa analizirana je metodom kvantitativne analize lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu. Ovim istraživanjem obuhvaćena je ekspresija SOD, CAT, GSS, GR, GST, GPx, GCL, Bak, Bax, Bcl-2, Akt1, MAPK1 i NFkB proteina. Nivo ekspresije svakog proteina ponaosob prikazan je u odnosu na nivo ekspresije netretirane kontrole. Analize su urađene za svaku ćelijsku liniju ponaosob, a na kraju su analizirane razlike u nivou ekspresije ispitivanih proteina između ćelijskih linija MRC-5 i A549. Poređenje rezultata ekspresije gena između dve ispitivane ćelijske linije bilo je otežano činjenicom da je ekspresija ispitivanih gena bila mnogo manja u A549 u poređenju sa MRC-5 ćelijama, što se može objasniti razlikom u genskoj ekspresiji i signalnim putevima ćelije.

Nivo ekspresije ispitivanih proteina određivan je i nakon tretmana ćelija sa resveratrolom i proantocijanidolima, odnosno kombinacija ova dva antioksidanta sa SWCNT. Resveratrol i proantocijanidoli kao i većina drugih prirodnih polifenola poznati su po svojim antioksidativnim svojstvima. Međutim važno je napomenuti da pozitivan uticaj ovih jedinjenja nije uvek u vezi sa njihovim antioksidativnim sposobnostima. Sve je više dokaza o brojnim drugim protektivnim mehanizmima ovih jedinjenja u odbrani ćelije od oksidativnog stresa, koji su nezavisni od konvencionalnih antioksidativnih mehanizama. Na primer, poznato je da resveratrol i proantocijanidoli stupaju u interakciju sa signalnim putevima u ćeliji i utiču na gensku ekspresiju, uz posledičnu modulaciju specifične enzimske aktivnosti i ćelijskog odgovora na oksidativni stres [91].

Bcl-2 je ključni regulatorni protein u unutrašnjem (mitohondrijalnom) putu apoptoze. Kao protein prisutan u spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, formiranjem heterodimera sa proapoptotskim proteinima poput Bax proteina, inhibicijom oslobađanja citohroma C i regulacijom mitohondrijalnog transmembranskog potencijala Bcl-2 ispoljava svoje antiapoptotske efekte.

Profil ekspresije anti-apoptotskog regulatornog proteina Bcl-2 u MRC-5 i A549 ćelijama pokazao je različite rezultate nakon tretmana sa jednoslojnim ugljeničnim nanocevima. U MRC-

5 ćelijama tretman sa SWCNT nije indukovao promenu ekspresije proteina Bcl-2 u odnosu na kontrolne vrednosti, dok je isti tretman u A549 ćelijama doveo do gašenja Bcl-2 proteina.

Utvrđena razlika u ekspresiji Bcl-2 proteina nakon tretmana sa SWCNT u skladu je sa rezultatima Yuanqin i sar. koji su nakon tretmana makrofaga miša (RAW 264.7 ćelija) višeslojnim ugljeničnim nanocevima takođe opisali smanjenje ekspresije Bcl-2 proteina [92].

Posmatrajući ekspresiju proteina Bcl-2, kao važnog proteina u mitohondrijalnom putu apoptoze, i poređenjem sa rezultatima merenja specifične apoptoze u našem eksperimentu primećuje se da gašenje Bcl-2 proteina u A549 ćelijskoj liniji nije dovelo do povećanja specifične apoptoze merene protočnom citometrijom. Koehler i sar. su primetili da gašenje Bcl-2 proteina takođe nije dovelo do povećanja apoptoze, što smo i mi pokazali našim eksperimentima sa A549 ćelijama [93].

Različit odgovor između dve ispitivana ćelijske linije primećen je i nakon tretmana kombinacijama SWCNT sa antioksidantima. Za resveratrol i proantocijanidole je poznato da u mnogim ćelijskim linijama indukuju apoptozu smanjenjem ekspresije antiapoptotskog Bcl-2 proteina [94, 95]. Posmatrajući ekspresiju Bcl-2 gena u MRC-5 ćelijama primećuje se da tretman sa 100 µg/mL SWCNT nije uticao na promenu profila ekspresije Bcl-2 gena, za razliku od tretmana kombinacijom SWCNT sa resveratrolom. Nakon ćelijskog tretmana kombinacijom 100 µg/mL SWCNT sa 50 µg/ml resveratrola ekspresija Bcl-2 gena bila je povećana u MRC-5 ćelijama. Promena ekspresionog profila Bcl-2 gena nakon tretmana kombinacijom SWCNT sa resveratrolom nije primećena u A549 ćelijama.

Takođe, različit nivo ekspresije Bcl-2 proteina u obe ćelijske linije dobijen je i nakon tretmana sa proantocijanidolima, odnosno kombinacijom SWCNT sa proantocijanidolima. Dok u MRC-5 ćelijama nije bilo promene u ekspresiji Bcl-2 gena nakon navedenih tretmana, u A549 ćelijama tretman sa 100 µg/mL SWCNT je smanjio, dok je tretman sa 10 µg/ml proantocijanidola povećao ekspresiju Bcl-2 gena. Tretman kombinacijom SWCNT sa proantocijanidolima smanjio je ekspresiju Bcl-2 gena ukazujući na dominantan efekat SWCNT u kombinaciji sa proantocijanidolom kao antioksidantom.

Bax protein prisutan u citosolu u obliku monomera, nakon oligomerizacije i integracije sa mitohondrijalnom membranom omogućava oslobađanje apoptogenih faktora poput citohroma C i

aktivaciju kaskade kaspaza. Bak je integralni protein mitohondrijalne membrane, koji nakon konformacione promene formira krupnije agregate i takođe spada u grupu proapoptotskih proteina koji pokreću proces apoptoze. Bax i Bak proteini prisutni su i na nivou endoplazmatskog retikuluma, gde kontrolom koncentracije kalcijuma učestvuju u regulaciji apoptoze.

Slično kao kod ekspresije Bcl-2 proteina, tretman MRC-5 ćelija sa SWCNT nije rezultirao promenom u ekspresiji Bax i Bak proteina. Kako nakon tretmana sa SWCNT u MRC-5 ćelijama nije bilo promene u ekspresiji ispitivanih anti-apoptotskih, i proapoptotskih proteina, dobijeni rezultati ukazuju da proces apoptoze nije bio indukovao kao posledica delovanja SWCNT, što je u skladu na našim rezultatima merenja specifične apoptoze na protočnom citometru. Takođe posmatranjem MRC-5 ćelija elektronskim mikroskopom nisu primećene ćelije sa tipičnim karakteristikama apoptoze, kao što su kondenzacije hromatina i bubrenje membrane.

Međutim posmatrajući ekspresiju ova dva proapoptotska proteina u A549 ćelijama nakon istog tretmana uočava se smanjenje ekspresije u poređenju sa netretiranom kontrolom. Iako brojni radovi ukazuju da tretman sa SWCNT indukuje apoptozu, aktivaciju pro-apoptotskih i istovremeno gašenje antiapoptotskih proteina, Hitoshi i sar. su pokazali da nakon tretmana humanih bronhijalnih ćelija epitela (NHBE) sa SWCNT dolazi do smanjenja nivoa ekspresije Bax i Bcl-2 proteina, odnosno da NHBE ćelije ne pokreću proces apoptoze nakon tretmana sa SWCNT [96]. Poznato je da važnu ulogu u regulaciji unutrašnjeg puta apoptoze ima balans između proapoptotskih i antiapoptotskih proteina, i da upravo od odnosa ovih članova Bcl-2 porodice zavisi da li ćelija živi ili umire [97]. Biološki odgovor kao posledica tretmana sa SWCNT može varirati kao posledica brojnih faktora poput karakteristika SWCNT, doze, vremena inkubacije, ali i kao rezultat različite osetljivosti različitih ćelija na tretman, pa je u ovoj činjenici moguće tražiti odgovor na različit profil ekspresije proapoptotskih i antiapoptotskih proteina u MRC-5 i A549 ćelijama. Takođe, poznato je da maligne ćelije često imaju mutacije koji im omogućavaju da menjaju balans između proapoptotskih i antiapoptotskih signala, čineći ih često otpornijim na apoptozu u odnosu na zdrave ćelije.

Ekspresija Bak proteina u obe ispitivane ćelijske linije bila je povećana nakon tretmana kombinacijom 100 µg/mL SWCNT sa 50 µg/mL resveratrola u poređenju sa ćelijama koje su bile tretirane samo sa 100 µg/mL SWCNT. Kombinacija 100 µg/mL SWCNT sa 10 µg/mL

proantocijanidola nije statistički značajno menjala profil ekspresije Bak gena u odnosu na tretman sa SWCNT. Promene u ekspresiji Bax gena koje su primećene nakon tretmana sa 100 µg/mL SWCNT nisu se statistički značajno razlikovale od rezultata dobijenih ćelijskim tretmanom kombinacijama SWCNT sa resveratrolom i proantocijanidolima.

Nuklearni faktor κB predstavlja porodicu strukturno srodnih transkripcionih faktora prisutnih u citoplazmi svih ćelija, koji nakon aktivacije i translokacije do jedra učestvuju u mehanizmima odbrane od ćelijskog stresa, ali i regulaciji procesa imunološkog odgovora, inflamaciji, apoptozi i ćelijskoj proliferaciji [98]. Takođe je poznato da reaktivne vrste kiseonika poput hidroksil radikala ili tzv. „singlet kiseonika“ mogu dovesti do aktivacije NFκB i njegove nuklearne translokacije i da je takva aktivacija povezana sa ćelijskom smrću, bilo putem apoptoze ili nekroze. Imajući u vidu da je jedan od načina citotoksičnog delovanja SWCNT upravo generisanje slobodnih vrsta kiseonika i indukcija oksidativnog stresa, merena je promena profila ekspresija NFκB u zdravim MRC-5 i malignim A549 ćelijama.

Ekspresija NFκB proteina u obe ispitivane ćelijske linije nije bila promenjena nakon tretmana sa SWCNT tokom 24h. Ukoliko poredimo ekspresiju NFκB proteina nakon tretmana kombinacijom SWCNT i resveratrola primećuje se da u obe ćelijske linije dolazi do povećanja ekspresije u poređenju sa kontrolom. Zanimljivo je da u MRC-5 ćelijskoj liniji tretmani sa 100 µg/mL SWCNT odnosno 50 µg/mL resveratrola nisu menjali ekspresiju ovog proteina, dok je tretman kombinacijom ova dva jedinjenja povećavao ekspresiju NFκB gena. Uchida i sar. su zapazili da resveratrol u određenim uslovima može dovesti do pojačavanja transkripcione aktivnosti NF-κB, dok su Pacurari i sar. utvrdili da SWCNT povećavaju ekspresiju NFκB u normalnim i malignim ćelijama mezotela [99, 30]. U našim eksperimentima povećanje ekspresije dobijeno je jedino nakon kotretmana, što ostavlja prostora za buduća istraživanja.

Tretman MRC-5 ćelija sa 100 µg/mL SWCNT odnosno 10 µg/mL proantocijanidola nije statistički značajno menjao ekspresiju NF-κB gena, ali je zanimljivo da je tretman kombinacijom SWCNT sa proantocijanidolima povećao ekspresiju. Rezultati ekspresije NF-κB gena u A549 ćelijama su pokazali da nakon tretmana sa 100 µg/mL SWCNT nije došlo do promene u ekspresiji, ali je povećanje ekspresije NF-κB gena primećeno nakon tretmana sa proantocijanidolima, iako se u radovima mogu pronaći podaci o smanjenju ekspresije NF-κB gena nakon tretmana sa proantocijanidolima [100, 101]. Efekat povećanja genske ekspresije NF-

kB proteina nakon tretmana sa proantocijanidolima gubio se nakon tretmana kombinacijom SWCNT sa proantocijanidolima.

Mitogenom aktivirana protein kinaza je serin-treonin protein kinaza koja učestvuje u regulaciji brojnih ćelijskih funkcija poput proliferacije, genske ekspresije, diferencijacije, mitoze, ćelijskog preživljavanja i apoptoze. U uslovima povećanje produkcije ROS molekula, i iscrpljivanja antioksidativnih kapaciteta ćelije, dolazi do ROS posredovane oksidativne modifikacije MAPK signalnih molekula i aktivacije MAPK. Zapravo mesto produkcije, koncentracija i kinetika ROS molekula, kao i ćelijski antioksidativni status ključni su faktori koji određuju efekat ROS molekula na aktivaciju MAPK signalnih puteva.

Nakon tretmana sa SWCNT u dozi od 100 µg/mL tokom 24h, ekspresija MAPK1 u MRC-5 ćelijama bila je smanjena, a isti odgovor je primećen i nakon tretmana kombinacijama SWCNT sa resveratrolom i proantocijanidolima. Zapravo tretman kombinacijama SWCNT sa dva ispitivana antioksidanta takođe je smanjio ekspresiju gena za ovaj protein u odnosu na kontrolu, ali se nije statistički značajno razlikovao u odnosu na tretman sa 100 µg/mL SWCNT.

Za razliku od MRC-5 ćelija, tretman sa SWCNT u A549 ćelijama nije uticao na profil ekspresije gena za ovaj proteina. Do sada nije utvrđen konkretan obrazac delovanja ugljeničnih nanocevi u kontekstu promene ekspresionog profila MAP kinaza. Snyder-Talkington i sar. su ukazali da nakon tretmana sa višeslojnim ugljeničnim nanocjevima u epitelnim ćelijama disajnih puteva čoveka nije došlo do promene u ekspresiji MAPK [102]. Rezultati merenja promene ekspresije MAPK1 u našem eksperimentu na A549 ćelijama u skladu su sa rezultatima Snyder-Talkington i sar. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da efekti ugljeničnih nanocevi između ostalog zavise i od tipa ćelija.

Tačna uloga resveratrola u MAPK signalnom putu još uvek nije razjašnjena, a podaci iz literature često su kontradiktorni i zahtevaju dalja istraživanja. Razlog za različite literaturne podatke o uticaju resveratrola na ekspresiju MAPK proteina može biti i upotreba velikog broja različitih ćelija u ispitivanjima. Iako sam resveratrol, slično kao i SWCNT nisu menjale profil ekspresije MAPK proteina u A549 ćelijama, nakon tretmana kombinacijom SWCNT sa ovim antioksidantom primećuje se povećanje ekspresije gena za MAP kinazu.

Akt-1 je važan modulator ćelijske proliferacije, a poznato je da povišen nivo Akt-1 proteina pokreće antiapoptotske efekte kao i aktivaciju NFκB proteina. Primećeno smanjenje ekspresije Akt-1 proteina u A549 ćelijama nakon tretmana sa SWCNT u našim eksperimentima teško je uporediti sa rezultatima drugih autora koji su u većini slučajeva ispitivali aktivnost Akt-1 proteina, a ne njegovu ekspresiju. U radovima brojnih autora utvrđeno je da se delovanjem ugljeničnih nanocevi zapravo povećava aktivnost ovog proteina. Profil ekspresije gena za Akt-1 protein u MRC-5 ćelijama nije bio promenjen nakon tretmana sa SWCNT. Promene u ekspresiji gena za Akt-1 protein u MRC-5 ćelijama nisu primećene ni nakon tretmana kombinacijama SWCNT sa dva ispitivana antioksidanta. Tretman sa 100 µg/mL SWCNT smanjio je ekspresiju Akt-1 gena u A549 ćelijama, a tretman kombinacijom SWCNT sa 10 µg/mL proantocijanidola nije se statistički značajno razlikovao od tretmana sa 100 µg/mL SWCNT. Zanimljivo je da iako su SWCNT u A549 ćelijama smanjile ekspresiju Akt-1 gena, dok sam resveratrol nije značajno menjao ekspresiju, kombinacija SWCNT sa resveratrolom dovela je do povećanja ekspresije ovog proteina.

SOD enzim je endogeni hvatač slobodnih radikala koji katalizuje dismutaciju visoko reaktivnog O_2^- do H_2O_2 . Efekat tretmana MRC-5 i A549 ćelija sa SWCNT pokazao je potpuno suprotan efekat na profil ekspresije superoksid dismutaze. Naime, nakon tretmana MRC-5 ćelija sa 100 µg/mL SWCNT tokom 24h ekspresija gena za SOD je bila smanjena, a smanjenje ekspresije zabeleženo je i nakon tretmana kombinacijama SWCNT sa antioksidantima. Moguće objašnjenje za dobijene rezultate može biti da su SWCNT indukovale oksidativni stres koji prevazilazi antioksidativne kapacitete ćelije, nakon čega je došlo do snažnog smanjenja (*downregulation*) ekspresije, čak i nakon tretmana kombinacijama SWCNT sa antioksidantima.

Isti tretman u A549 ćelijama uslovio je povećanje ekspresije gena za SOD, nakon tretmana sa 100 µg/mL SWCNT, ali i nakon tretmana kombinacijama SWCNT sa antioksidantima. Za resveratrol je poznato da može značajno smanjiti koncentraciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i zaštititi ćeliju od smrti. Jedan od načina na koji resveratrol ispoljava svoj protektivni efekat jeste i povećanje ekspresije gena čiji su produkti uključeni u antioksidativnu zaštitu, poput gena za SOD [103]. Rezultati merenja ekspresije gena za SOD nakon tretmana A549 ćelija sa resveratrolom povećali su ekspresiju ovog gena što je u skladu sa rezultatima drugih autora. Iako su tretmani sa 100 µg/mL SWCNT i 50 µg/mL resveratrola povećali nivo

ekspresije ovog gena, najveće povećanje (aditivni efekat) primećeno je nakon tretmana kombinacijom SWCNT sa resveratrolom. Poput resveratrola, i proantocijanidoli mogu povećati ekspresiju gena za SOD [54]. Naši rezultati tretmana A549 ćelija na profil ekspresije gena za SOD u skladu su sa rezultatima drugih autora. Slično poput kombinacije sa resveratrolom, iako u manjoj meri, tretman kombinacijom SWCNT sa proantocijanidolima povećavao je ekspresiju SOD proteina.

Kako je poznato da i jednoslojne i višeslojne ugljenične nanocevi mogu povećati intracelularne koncentracije ROS molekula, moguće je da povećanje ekspresije gena za SOD u A549 ćelijama predstavlja pokušaj ćelije da se izbori sa stanjem oksidativnog stresa indukovano tretmanom sa SWCNT. Naši rezultati dobijeni merenjem ekspresije gena za SOD u MRC-5 ćelijama u skladu su sa nalazima Sarkar i sar. koji su pokazali da nakon tretmana humanih normalnih fibroblasta sa SWCNT dolazi do smanjenja ekspresije gena za SOD [104].

Objašnjenje za potpuno različit odgovor u kontekstu profila ekspresije gena za SOD u MRC-5 i A549 ćelijama moguće je tražiti u drugačijem odgovoru, odnosno različitoj osetljivosti ćelija na tretman sa ugljeničnim nanocevima, ali i različitim eksperimentalnim protokolima.

Enzim katalaza konvertuje reaktivne vrste kiseonika poput vodonik peroksida do vode i kiseonika, i na taj način štiti ćeliju od toksičnih efekata vodonik peroksida. Analizirajući ekspresiju gena za katalazu u MRC-5 i A549 ćelijama nakon tretmana sa SWCNT primećuje se da nema promene u ekspresiji ovog gena u odnosu na kontrolne ćelije. Sarkar i sar. ukazali su na povećanje ekspresije gena za CAT nakon tretmana humanih normalnih fibroblasta sa SWCNT, dok su Lee i sar. ukazali da nakon tretmana *Oryzias latipes* ribica sa MWCNT nivo ekspresije može biti smanjen, nepromenjen ili povećan u zavisnosti od dužine tretmana, ali i organa u kojem je merena ekspresija gena za CAT [104, 105]. Značajnije promene u ekspresiji gena za katalazu nisu primećene u ispitivanim ćelijskim linijama čak ni nakon tretmana kombinacijama SWCNT sa antioksidantima.

Takođe, moguće je da navedeni tretman u našim eksperimentima nije indukovao dovoljnu količinu oksidativnog stresa koji bi uticao na promenu ekspresije gena za CAT.

Nakon tretmana sa SWCNT u MRC-5 i A549 ćelijama nisu primećene promene u ekspresiji gena za glutation sintetazu, jednog od dva ključna enzima uključenih u *de novo* sintezu

glutationa. Drugi enzim neophodan za sintezu GSH jeste glutamat-cistein ligaza, koji katalizuje reakciju glutationa i cisteina, a koji je kodiran genom za GCL. U našem eksperimentu ispitivana je i promena u ekspresiji gena za GCL nakon tretmana sa SWCNT i primećeno je da u MRC-5 ćelijama nema promene profila ekspresije za ovaj gen. Ipak, tretman sa SWCNT u A549 ćelijama smanjio je ekspresiju gena za GCL. Kako je u našem istraživanju određivana količina ukupnog glutaciona u obe ćelijske linije nakon tretmana sa SWCNT, moguće je ukrstiti rezultate genske ekspresije i količine glutaciona.

Kako u MRC-5 ćelijama nije bilo promene u ekspresiji gena za glutacionu sintetazu i glutamat-cistein ligazu u odnosu na kontrolu, u MRC-5 ćelijama određivana je količina glutaciona nakon tretmana sa SWCNT u odnosu na kontrolu. Dobijeni rezultati koji ukazuju da u MRC-5 ćelijama količina glutaciona nije bila promenjena u odnosu na kontrolu nakon tretmana u skladu je sa rezultatima dobijenim ispitivanjem genske ekspresije.

U A549 ćelijama, iako nije primećena promena ekspresije gena za glutacionu sintetazu, primećeno je smanjenje ekspresije gena za GCL. Poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima merenja ukupne količine glutaciona u A549 ćelijama primećuje se da je uprkos smanjenju ekspresije gena za GCL došlo do povećanja količine ukupnog glutaciona u A549 ćelijama nakon tretmana sa SWCNT. Međutim, rezultati genske ekspresije, sami po sebi, ne moraju značiti da dolazi i do istovetne promene u količini glutaciona, već ukazuju na mogućnost posttranslacione regulacije. Zanimljivo je da je nakon tretmana sa kombinacijom SWCNT i resveratrola u obe ispitivane ćelijske linije došlo do povećanja ekspresije gena za GCL u odnosu na tretman sa SWCNT, što je u skladu sa nalazima Kode i sar. koji su ukazali na povećanje ekspresije gena za GCL nakon tretmana sa resveratrolom [106].

Glutaciona reduktaza je esencijalan enzim neophodan za konverziju oksidovanog glutaciona do svog redukovano oblika. Merenjem ekspresije gena za GR primećeno je da u MRC-5 ćelijama nije bilo promene u ekspresiji nakon tretmana sa SWCNT, za razliku od A549 ćelija gde je isti tretman povećao ekspresiju. Sa druge strane merenjem specifične aktivnosti GR enzima u obe ćelijske linije dobijeni su rezultati koji ukazuju da je tretman MRC-5 ćelija sa SWCNT doveo do smanjenja specifične aktivnosti, a isti tretman u A549 ćelijama nije menjao specifičnu aktivnost glutacione reduktaze. Objašnjenje za dobijene rezultate moguće je tražiti u činjenici da se regulacija genske ekspresije može odvijati i posttranskripciono.

Za resveratrol je poznato da osim antioksidativnog delovanja, modulira i ekspresiju velikog broja gena, uključujući i povećanje ekspresije gena za glutathion reduktazu [107]. Imajući u vidu uticaj resveratrola na gensku modulaciju ispitivana je promena ekspresije nakon tretmana kombinacijom SWCNT sa ovim antioksidantom. U MRC-5 ćelijama tretmani sa 100 µg/mL SWCNT odnosno 50 µg/mL resveratrola nisu menjali ekspresiju gena za GR, ali je ekspresija povećana nakon tretmana kombinacijom SWCNT i resveratrola. U A549 ćelijama tretmani sa 100 µg/mL SWCNT odnosno 50 µg/mL resveratrola povećali su ekspresiju gena za GR, ali kombinacijom ova dva jedinjenja nije primećena statistički značajna razlika u odnosu na tretmane sa pojedinačnim supstancama.

Slično resveratrolu, i proantocijanidoli moduliraju ekspresiju gena antioksidativnih enzima i povećavaju ekspresiju gena za GR. Iako je tretman sa 10 µg/mL proantocijanidola u A549 ćelijama povećao ekspresiju ovog gena, tretman kombinacijom 100 µg/mL SWCNT sa 10 µg/mL proantocijanidola nije se bitno razlikovao od tretmana sa 100 µg/mL SWCNT u dve ispitivane ćelijske linije.

Posmatrajući ekspresiju gena za GST kao važnog proteina u reakciji detoksifikacije molekula ROS-a primećuje se različit odgovor u MRC-5 i A549 ćelijama. Dok je u MRC-5 ćelijama nakon tretmana sa SWCNT došlo do smanjenje genske ekspresije GST proteina, isti tretman nije doveo do promene u ekspresiji ovog gena u A549 ćelijama. Yuan i sar. su ispitivali uticaj grafena i jednoslojnih ugljeničnih nanocevi na proteinski profil malignih ćelija jetre (HepG2 ćelija), i primećeno je da je nakon delovanja SWCNT i grafena povećana ekspresija gena za GST [108].

Nepromenjen profil ekspresije *GST* gena u A549 ćelijama ukazuje da detoksifikacija SWCNT kao nanomaterijala možda nije posredovana glutathion S-transferaza putem. U prilog ovome idu i rezultati merenja specifične aktivnosti GST enzima u A549 ćelijama, gde je primećeno da nakon tretmana sa SWCNT nema promene u specifičnoj aktivnosti u odnosu na kontrolne ćelije. Profil ekspresije gena za GST ostaje nepromenjen u odnosu na tretman sa 100 µg/ml SWCNT čak i nakon tretmana kombinacijom ovog nanomaterijala sa dva ispitivana antioksidanta.

Jedan od načina eliminacije ROS molekula jeste i uz pomoć glutaciona peroksidaze, enzima koji katalizuje konverziju vodonik peroksida do vode uz pomoć glutaciona kao koenzima. Profil ekspresije gena za GPx u MRC-5 i A549 ćelijama je različit nakon tretmana sa SWCNT. Tretman sa 100 µg/mL SWCNT u MRC-5 ćelijama ne utiče na profil ekspresije gena za GPx, dok je za iste uslove dobijen značajno niži nivo ekspresije u A549 ćelijama. Posebno su zanimljivi rezultati ekspresije ovog gena u A549 ćelijama nakon tretmana kombinacijom SWCNT sa dva ispitivana antioksidanta za koje je poznato da mogu povećati ekspresiju ovog gena [109, 54]]. Iako je tretman A549 ćelija sa 100 µg/mL SWCNT smanjio ekspresiju, a tretman sa 50 µg/mL resveratrola povećao, tretman kombinacijom SWCNT sa resveratrolom takođe je povećao nivo ekspresije, ukazujući na dominantan efekat resveratrola. Suprotan efekat primećen je nakon tretmana sa 10 µg/mL proantocijanidola koji su pojedinačno i u kombinaciji smanjivali ekspresiju gena za GST.

Oksidativni stres definisan kao stanje narušenog balansa između produkcije i eliminacije molekula ROS jedan je od ključnih mehanizama u regulaciji ćelijskog odgovora. Utvrđeno je da važnu ulogu u mehanizmima citotoksičnosti nanomaterijala, uključujući i SWCNT ima i generisanje reaktivnih vrsta kiseonika, odnosno indukcija oksidativnog stresa. Efekat inkubacije sa SWCNT pojedinačno i u kombinaciji sa antioksidantima na anti-oksidativni status u MRC-5 i A549 ćelijama ispitan je merenjem biomarkera oksidativnog stresa. U našem radu su kao biomarkeri oksidativnog stresa merene specifične aktivnosti enzima superoksida dismutaze, glutation-S-transferaze, glutation reduktaze, katalaze, glutaciona peroksidaze, a određivana je i količina ukupnog glutaciona u ćelijama.

Brojne studije su se bavile ispitivanjem uticaja SWCNT na količinu glutaciona i enzime antioksidativne zaštite u ćeliji. Smatra se da su snižene vrednosti antioksidativnih enzima pokazatelj oksidativnog stresa, dok se povećane vrednosti istih enzima mogu tumačiti kao odgovor ćelije na oksidativni stres. Iako se u literaturi mogu pronaći podaci o delovanju ugljeničnih nanocevi na specifičnu aktivnost enzima antioksidativne zaštite, ovi podaci često su neusaglašeni i međusobno kontradiktorni, što može biti posledica različitih fizičko-hemijskih osobina ispitivanih nanocevi, upotrebe različitih ćelija i eksperimentalnih protokola, kao i brojnih drugih faktora.

S obzirom da je specifična aktivnost enzima antioksidativne zaštite određivana i nakon tretmana sa resveratrolom i proantocijanidolima, kao i kombinacijama ova dva antioksidanta sa SWCNT važno je istaći dosadašnja saznanja o delovanju ova dva prirodna polifenolna jedinjenja na aktivnost enzima antioksidativne zaštite. Iako je antioksidativni efekat resveratrola poznat odavno, još uvek nije razjašnjeno da li je za njegove efekte primarno odgovorna sposobnost hvatanja ROS molekula, ili aktivacija različitih ćelijskih signalnih puteva koji povećavaju antioksidativnu odbranu ćelije. Proantocijanidoli zbog svoje kateholaminske strukture mogu helirati prelazne metale poput bakra i gvožđa, ali i slično resveratrolu modulirati aktivnost nekoliko enzima sistema antioksidativne zaštite.

Sa druge strane postoje podaci i o prooksidativnom delovanju ovih jedinjenja gde su kao rezultat tretmana sa prirodnim polifenolima poput resveratrola i proantocijanidola moguća tri različita ćelijska odgovora. Tip ćelijskog odgovora zavisi direktno od koncentracije i prooksidativne prirode ispitivanih polifenola: (a) izlaganje niskim koncentracijama indukuje blagi oksidativni stres i pokreće antioksidativne odbrambene mehanizme, (b) tretman nešto višim koncentracijama nadjačava antioksidativne kapacitete ćelije i pokreće apoptozu, (c) visoke koncentracije vrlo brzo nadmašuju odbrambene kapacitete ćelije, izazivaju direktna oksidativna oštećenja i nekrozu [110].

Glutation-S-transferaza katalizuje konjugaciju elektrofilnih jedinjenja sa glutationom, nakon čega se nastali konjugat izbacuje iz ćelije. Kao detoksifikujući enzim učestvuje i u biotransformaciji brojnih ksenobiotika i metabolizmu lekova.

Primena SWCNT u MRC-5 i A549 ćelijama u odnosu na kontrolne vrednosti ne dovodi do promene specifične aktivnosti glutacion-S-transferaze. Naši rezultati merenja specifične aktivnosti glutacion-S-transferaze u skladu su sa rezultatima ispitivanja uticaja nanočestice fulerenola, čestice strukturno bliske ugljeničnim nanocjevima na specifičnu aktivnost GST enzima u epitelnim ćelijama jajnika hrčka (CHO ćelijama) gde nisu zabeležene bitne promene specifične aktivnosti u odnosu na kontrolu [111]. Tretman MRC-5 ćelija kombinacijom SWCNT sa resveratrolom i proantocijanidolima doveo je do smanjenja specifične aktivnosti GST enzima, dok je isti efekat primećen i u A549 ćelijama, ali samo nakon tretmana sa resveratrolom.

Glutation peroksidaza predstavlja drugu liniju antioksidativne odbrane dismutacijom vodonik peroksida do vode i molekularnog kiseonika, štiteći na taj način ćeliju od oksidativnog stresa. U našem eksperimentu nakon tretmana MRC-5 ćelija sa 100 µg/mL SWCNT primećeno je povećanje specifične aktivnosti glutacione peroksidaze u odnosu na kontrolu, dok nakon istog tretmana u A549 ćelijama nije zabeležena promena specifične aktivnosti ovog enzima. U jednoj studiji ispitivan je uticaj višeslojnih ugljeničnih nanocevi na specifičnu aktivnost glutacione peroksidaze u endotelnim ćelijama umbilikalne vene (HUVEC) i pokazano je da se specifična aktivnost glutacione peroksidaze povećavala odnosno smanjivala u odnosu na kontrolu u zavisnosti od koncentracije višeslojnih ugljeničnih nanocevi [112]. Jedan od mogućih odgovora za ovakve rezultate može biti da određene koncentracije ugljeničnih nanocevi dovode do povećanog stvaranja ROS molekula, remete balans između pro- i antioksidativnih mehanizama zbog čega dolazi do stimulacije GPx enzima u pokušaju da se ćelija izbori sa povećanom količinom ROS molekula. Sa druge strane pri visokim koncentracijama ugljeničnih nanocevi količina novonastalih ROS molekula nadmašuje kompenzatorne mehanizme ćelije, zbog čega ćelija smanjuje aktivnost enzima antioksidativne zaštite. Moguće je da isti uzrok bude objašnjenje i za različit odgovor dve ćelijske linije i u našem eksperimentu. Tretman MRC-5 i A549 ćelija kombinacijom SWCNT sa dva ispitivana antioksidanta nije menjao specifičnu enzimsku aktivnost u odnosu na ćelije tretirane sa 100 µg/mL SWCNT.

Glutation reduktaza katalizuje reakciju redukcije oksidovanog glutaciona u redukovani glutacion uz učešće NADPH kao redukujućeg faktora. Zapravo najčešći antioksidativni mehanizam u ćeliji čine glutacion, glutacion reduktaza i glutacion peroksidaza, zajedno sa nikotinamid adenin dinukleotid fosfatom. Ovim protektivnim mehanizmom uklanja se vodonik peroksid, ali i drugi slobodni radikali.

Nakon tretmana sa SWCNT u A549 ćelijama nije bilo značajne promene specifične aktivnosti glutacione reduktaze, ali je primećeno povećanje količine redukovanog glutaciona, što je imajući u vidu ulogu ovog enzima i očekivano. Zanimljivo je da u MRC-5 ćelijama nakon delovanja SWCNT dolazi do smanjenja specifične aktivnosti glutacione reduktaze, ali da se merenjem količine redukovanog glutaciona ne beleže promene u odnosu na kontrolu. Proantocijanidoli sami i u kombinaciji sa SWCNT statistički su značajno povećali specifičnu

aktivnost glutation reduktaze u MRC-5 ćelijama, što je u skladu sa rezultatima merenja ukupne količine glutationa koja je takođe bila povećana.

Superoksid dismutaza katalizuje reakciju dismutacije superoksid anjon radikala u vodonik peroksid i molekularni kiseonik. U studiji Wang i sar. ispitivana je specifična aktivnost superoksid dismutaze u ćelijama feohromocitoma pacova (PC12 ćelijama) nakon tretmana sa dve vrste SWCNT koje su se međusobno razlikovale u dužini i primećeno je smanjenje aktivnosti SOD enzima u oba navedena tretmana [113]. Takođe u radu Chen i sar. određivana je aktivnost superoksid dismutaze u ćelijama makrofaga miša (RAW264.7 ćelije) i A549 ćelijama nakon tretmana sa višeslojnim ugljeničnim nanocevima i dobijeni slični rezultati koji ukazuju sa smanjenje aktivnosti ovog enzima [114].

Rezultati dobijeni u našim eksperimentima takođe pokazuju da nakon delovanja SWCNT u MRC-5 i A549 ćelijama dolazi do smanjenja specifične aktivnosti superoksid dismutaze, što je u skladu sa radovima Wang i Chen. Nakon uočenog smanjenja specifične aktivnosti SOD enzima u obe ispitivane ćelijske linije nakon tretmana sa SWCNT, ćelije su tretirane kombinacijom SWCNT sa antioksidantima. U poređenju sa tretmanom sa SWCNT kombinacije SWCNT sa resveratrolom, odnosno proantocijanidolima povećale su specifičnu aktivnost superoksid dismutaze u MRC-5 i A549 ćelijama, i na taj način povećale antioksidativni kapacitet ćelija.

Katalaza katalizuje razgradnju vodonik peroksida u kiseonik i vodu bez nastanka slobodnih radikala. U našem eksperimentu aktivnost katalaze ni u kontrolnim ni u tretiranim A549 i MRC-5 ćelijama nije se mogla detektovati.

Guan i sar. su opisali uticaj višeslojnih ugljeničnih nanocevi na strukturu enzima katalaze. Isti autori su spektroskopskim metodama utvrdili da zapravo dolazi do vezivanja MWCNT za aminokiselinske ostatke katalaze, što dovodi do stvaranja hidrofobne sredine aminokiselinskih ostataka [115]. Ova interakcija uslovljava je na kraju inhibiciju enzima katalaze, čime bi se mogla objasniti i nemogućnost detekcije katalaze u našim eksperimentima. Kako je poznato da od strukture enzima zapravo zavisi i njegova funkcija, moguće je da ova interakcija remeti fiziološke uloge enzima.

Glutation kao glavni intracelularni niskomolekularni tiol ima ključnu ulogu u odbrani ćelija od oksidativnog stresa, zbog čega je u našem eksperimentu određivana količina glutaciona

u MRC-5 i A549 ćelijama. Nakon tretmana sa SWCNT primećujemo različit odgovor u dve ispitivane ćelijske linije. Ukoliko poredimo nivo glutaciona u odnosu na kontrolu primećujemo da u MRC-5 ćelijama nema statistički značajne promene količine glutaciona, dok kod A549 ćelija beležimo povećanje količine glutaciona. Wang i sar. su ispitivali uticaj jednoslojnih ugljeničnih nanocevi na količinu glutaciona u ćelijama feohromocitoma pacova (PC12 ćelijama) i primećeno je da količina glutaciona u ćeliji zavisi od koncentracije primenjenih nanocevi [113]. Pri nižim koncentracijama (1-50 $\mu\text{g/mL}$) jednoslojnih ugljeničnih nanocevi nije bilo promene u količini glutaciona u ćelijama, što smo primetili i u našim eksperimentima na MRC-5 ćelijama, dok su visoke koncentracije (100-400 $\mu\text{g/mL}$) u eksperimentu Wang i sar. dovele do smanjenja količine glutaciona. Rezultati merenja količine glutaciona u A549 ćelijama, gde nakon tretmana sa SWCNT dolazi do povećanja njegove količine u suprotnosti su sa rezultatima Sharma i sar. koji su nakon tretmana sa SWCNT epitelnih ćelija pluća pacova primetili smanjenje količine glutaciona u ćelijama [116].

U odnosu na tretman sa 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT, u MRC-5 ćelijama tretman SWCNT sa resveratrolom povećao je količinu glutaciona što bi se moglo tumačiti kao protektivni efekat resveratrola, jer se povećanjem količine glutaciona u ćeliji povećavaju i antioksidativni kapaciteti ćelije.

Bolje razumevanje prirode i značaja molekularnih mehanizama koji leže u osnovi ćelijskog odgovora zdravih i malignih ćelija na delovanje ugljeničnih nanocevi pružiće nove mogućnosti kontrole njihove distribucije, degradacije, toksičnosti i primene.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih rezultata istraživanja biološkog odgovora dve humane ćelijske linije, normalnih fibroblasta pluća, MRC-5 i, adenokarcinoma pluća, A549, na tretman sa SWCNT pojedinačno i u kombinaciji sa antioksidantima može se zaključiti:

1. Nanočestica, jednoslojne ugljenične nanocevi (SWCNT) pokazuje umerenu citotoksičnost.
2. Antiproliferativni efekat nakon primene jednoslojnih ugljeničnih nanocevi više je izražen kod malignih ćelija A549 u poređenju sa normalnim MRC-5 ćelijama.
3. Citotoksični efekat primene jednoslojnih ugljeničnih nanocevi (SWCNT) u MRC-5 ćelijama nije umanjen primenom antioksidanata resveratrola i proantocijanidola u kombinaciji sa SWCNT, za razliku od malignih A549 ćelija gde je primena ova dva antioksidanta u niskim koncentracijama ispoljavala citoprotektivni efekat.
4. Jednoslojne ugljenične nanocevi ulaze u ćeliju i stupaju u interakciju sa ćelijskom membranom.
5. Apoptoza i nekroza nisu bili osnovni mehanizmi citotoksičnog delovanja jednoslojnih ugljeničnih nanocevi.
6. Kombinacijom jednoslojnih ugljeničnih nanocevi sa antioksidantima, resveratrolom i proantocijanidolima indukuje se veći procenat apoptoze i nekroze.
7. Komparativna analiza rezultata genske ekspresije MRC-5 i A549 ćelija nakon tretmana sa jednoslojnim ugljeničnim nanocevima pojedinačno i u kombinaciji sa antioksidantima ukazala je na kompleksnost i raznolikost biološkog odgovora ispitivanih ćelija.
8. Primena jednoslojnih ugljeničnih nanocevi u MRC-5 ćelijama dovodi po smanjenja specifične aktivnosti enzima superoksid dismutaze i glutacion reduktaze, povećava specifičnu aktivnost glutacion peroksidaze i ne utiče na promenu specifične aktivnosti glutacion S-transferaze i količine glutaciona u ćeliji.
9. Primena jednoslojnih ugljeničnih nanocevi u A549 ćelijama dovodi po smanjenja specifične aktivnosti enzima superoksid dismutaze, ne utiče na promenu specifične aktivnosti enzima glutacion reduktaze, glutacion peroksidaze i glutacion S-transferaze i dovodi do povećanja količine glutaciona u ćeliji.

7. LITERATURA

1. Roco MC. National nanotechnology initiative-past, present, future. Handbook on nanoscience, engineering and technology. Ed. Goddard, WA et al. CRC, Taylor and Francis, Boca Raton and London.—2007.—P. 2007:3-1.
2. ESF E. Nanomedicine: An ESF–European Medical Research Councils (EMRC) Forward Look Report. Strasbourg cedex, France. 2005.
3. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *nature*. 1991;354:56.
4. Tan JM, Arulselvan P, Fakurazi S, Ithnin H, Hussein MZ. A review on characterizations and biocompatibility of functionalized carbon nanotubes in drug delivery design. *Journal of Nanomaterials*. 2014;2014:111.
5. Muller J, Huaux F, Lison D. Respiratory toxicity of carbon nanotubes: how worried should we be?. *Carbon*. 2006;44:1048-56.
6. Murr LE, Bang JJ, Esquivel EV, Guerrero PA, Lopez DA. Carbon nanotubes, nanocrystal forms, and complex nanoparticle aggregates in common fuel-gas combustion sources and the ambient air. *Journal of Nanoparticle Research*. 2004;6:241-51.
7. Velasco-Santos C, Martí AL, Consultchi A, Castaño VM. Naturally produced carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters*. 2003;373:272-6.
8. Wu Q, Li Y, Li Y, Zhao Y, Ge L, Wang H, Wang D. Crucial role of the biological barrier at the primary targeted organs in controlling the translocation and toxicity of multi-walled carbon nanotubes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nanoscale*. 2013;5:11166-78.
9. Aillon KL, Xie Y, El-Gendy N, Berkland CJ, Forrest ML. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61:457-66.
10. Di Sotto A, Chiaretti M, Carru GA, Bellucci S, Mazzanti G. Multi-walled carbon nanotubes: lack of mutagenic activity in the bacterial reverse mutation assay. *Toxicology letters*. 2009;184:192-7.
11. Lobo AO, Corat MA, Antunes EF, Palma MB, Pacheco-Soares C, Garcia EE, Corat EJ. An evaluation of cell proliferation and adhesion on vertically-aligned multi-walled carbon nanotube films. *Carbon*. 2010;48:245-54.

12. Morimoto Y, Horie M, Kobayashi N, Shinohara N, Shimada M. Inhalation toxicity assessment of carbon-based nanoparticles. *Accounts of chemical research*. 2012;46:770-81.
13. Alazzam A, Mfoumou E, Stiharu I, Kassab A, Darnel A, Yasmeen A, Sivakumar N, Bhat R, Al Moustafa AE. Identification of deregulated genes by single wall carbon-nanotubes in human normal bronchial epithelial cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010;6:563-9.
14. Tian F, Cui D, Schwarz H, Estrada GG, Kobayashi H. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicology in vitro*. 2006;20:1202-12.) (Ong LC, Chung FF, Tan YF, Leong CO. Toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Archives of toxicology*. 2016;90:103-18.
15. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international*. 2013;2013.
16. Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Archives of toxicology*. 2012;86:1649-65.
17. Li Z, Xu X, Leng X, He M, Wang J, Cheng S, Wu H. Roles of reactive oxygen species in cell signaling pathways and immune responses to viral infections. *Archives of virology*. 2016:1-8.
18. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;29:222-30.
19. Han SG, Andrews R, Gairola CG. Acute pulmonary response of mice to multi-wall carbon nanotubes. *Inhalation toxicology*. 2010;22:340-7.
20. Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Piallier-Boyles M, Kinloch IA, Windle AH, Gehr P, Stone V. Relating the physicochemical characteristics and dispersion of multiwalled carbon nanotubes in different suspension media to their oxidative reactivity in vitro and inflammation in vivo. *Nanotoxicology*. 2010;4:331-42.
21. He X, Young SH, Fernback JE, Ma Q. Single-walled carbon nanotubes induce fibrogenic effect by disturbing mitochondrial oxidative stress and activating NF- κ b signaling. *Journal of clinical toxicology*. 2012.

22. Brown DM, Kinloch IA, Bangert U, Windle AH, Walter DM, Walker GS, Scotchford CA, Donaldson K, Stone VI. An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis. *Carbon*. 2007;45:1743-56.
23. Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, Young SH, Gao F, Tyurina YY, Oury TD, Kagan VE. Vitamin E deficiency enhances pulmonary inflammatory response and oxidative stress induced by single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice. *Toxicology and applied pharmacology*. 2007;221:339-48.
24. Shvedova AA, Pietroiusti A, Fadeel B, Kagan VE. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012;261:121-33.
25. Le Goff A, Holzinger M, Cosnier S. Enzymatic biosensors based on SWCNT-conducting polymer electrodes. *Analyst*. 2011;136:1279-87.
26. Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicological sciences*. 2004;77:117-25.
27. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*. 2007;87:315-424.
28. He X, Young SH, Schwegler-Berry D, Chisholm WP, Fernback JE, Ma Q. Multiwalled carbon nanotubes induce a fibrogenic response by stimulating reactive oxygen species production, activating NF- κ B signaling, and promoting fibroblast-to-myofibroblast transformation. *Chemical research in toxicology*. 2011;24:2237-48.
29. Bonner JC. Lung fibrotic responses to particle exposure. *Toxicologic pathology*. 2007;35:148-53.
30. Pacurari M, Yin XJ, Zhao J, Ding M, Leonard SS, Schwegler-Berry D, Ducatman BS, Sbarra D, Hoover MD, Castranova V, Vallyathan V. Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF- κ B, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environmental health perspectives*. 2008;116:1211.
31. Dong J, Ma Q. Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity. *Nanotoxicology*. 2015;9:658-76.

32. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26:239.
33. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407:770-6.) (Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:238-59.
34. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of toxicology*. 2013;87:1157-80.
35. Bell RAV, Megeney LA. Evolution of caspase-mediated cell death and differentiation: twins separated at birth. *Cell Death Differ*. 2017;24:1359-1368.
36. Yoo BH, Wu X, Derouet M, Haniff M, Eskelinen EL, Rosen K. Hypoxia-induced downregulation of autophagy mediator Beclin-1 reduces the susceptibility of malignant intestinal epithelial cells to hypoxia-dependent apoptosis. *Autophagy*. 2009;5:1166-79.
37. Mow BM, Blajeski AL, Chandra J, Kaufmann SH. Apoptosis and the response to anticancer therapy. *Current opinion in oncology*. 2001;13:453-62.
38. Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer*. 2010;9:135.
39. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*. 2012;19:107-20.
40. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Elsevier Health Sciences; 2014 Aug 27.
41. Soga M, Matsuzawa A, Ichijo H. Oxidative stress-induced diseases via the ASK1 signaling pathway. *International journal of cell biology*. 2012;2012.
42. Stankov K, Borisev I, Kojic V, Rutonjski L, Bogdanovic G, Djordjevic A. Modification of antioxidative and antiapoptotic genes expression in irradiated K562 cells upon fullereneol C60 (OH)₂₄ nanoparticle treatment. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2013;13:105-13.

43. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews*. 2014;94:329-54.
44. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell biochemistry and biophysics*. 2009;53:75-100.
45. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox biology*. 2013;1:45-9.
46. Chuang CC, McIntosh MK. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annual review of nutrition*. 2011;31:155-76.
47. Carter LG, D'Orazio JA, Pearson KJ. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocrine-related cancer*. 2014;21:R209-25.
48. Kim Y, Lee WH, Choi TH, Rhee SH, Park KY, Choi YH. Involvement of p21WAF1/CIP1, pRB, Bax and NF- κ B in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells. *International journal of oncology*. 2003;23:1143-9.
49. Tergaonkar V, Correa RG, Ikawa M, Verma IM. Distinct roles of I [kappa] B proteins in regulating constitutive NF-[kappa] B activity. *Nature cell biology*. 2005;7:921.
50. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *The Journal of Immunology*. 2000;164:6509-19.
51. Ren Z, Wang L, Cui J, Huoc Z, Xue J, Cui H, Mao Q, Yang R. Resveratrol inhibits NF- κ B signaling through suppression of p65 and IB kinase activities. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;68:689-94.
52. Das M, Das DK. Resveratrol and cardiovascular health. *Molecular aspects of medicine*. 2010;31:503-12.
53. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;22:749-60.

54. Puiggròs F, Llópiz N, Ardévol A, Bladé C, Arola L, Salvadó MJ. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53:6080-6.
55. Roy AM, Baliga MS, Elmets CA, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis through p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Neoplasia*. 2005;7:24-36.
56. Xu Y, Khaoustov VI, Wang H, Yu J, Tabassam F, Yoffe B. Freeze-dried grape powder attenuates mitochondria-and oxidative stress-mediated apoptosis in liver cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57:9324-31.
57. Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov AV. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and behavior*. 2014;4:108-22.
58. Bonanomi L, Gazzaniga A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. *European journal of respiratory diseases. Supplement*. 1979;111:45-51.
59. Shvedova A, Castranova V, Kisin E, Schwegler-Berry D, Murray A, Gandelsman V, Maynard A, Baron P. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2003;66:1909-26.
60. Pantarotto D, Briand JP, Prato M, Bianco A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chemical Communications*. 2004:16-7.) (Kam NW, Liu Z, Dai H. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angewandte Chemie*. 2006;118:591-5.
61. Shinde A, Tsai CS. Toxicity mechanism in fetal lung fibroblast cells for multi-walled carbon nanotubes defined by chemical impurities and dispersibility. *Toxicology Research*. 2016;5:248-58.
62. Pekić B, Kovač V, Alonso E, Revilla E. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. *Food Chemistry*. 1998;61:201-6.) (Pekić B, Kovač V. Postupak za dobijanje proantocijanidola ekstrakcijom semenki grožđa. YU Patent P-205/93.
63. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91:479-89.

64. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65:55-63.
65. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation*. 1984;22:27-55.
66. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
67. Aebi H. Catalase. *Methods of enzymatic analysis*. 1974:673-7.
68. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 1968;243:5753-60.
69. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*. 1974;249:7130-9.
70. Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1974;30:665-7.
71. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Translational Research*. 1967;70:158-69.
72. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1959;82:70-7.
73. Bender A, Opel D, Naumann I, Kappler R, Friedman L, Von Schweinitz D, Debatin KM, Fulda S. PI3K inhibitors prime neuroblastoma cells for chemotherapy by shifting the balance towards pro-apoptotic Bcl-2 proteins and enhanced mitochondrial apoptosis. *Oncogene*. 2011;30.
74. Kumarathasan P, Breznan D, Das D, Salam MA, Siddiqui Y, MacKinnon-Roy C, Guan J, de Silva N, Simard B, Vincent R. Cytotoxicity of carbon nanotube variants: a comparative in vitro exposure study with A549 epithelial and J774 macrophage cells. *Nanotoxicology*. 2015;9:148-61.
75. Davoren M, Herzog E, Casey A, Cottineau B, Chambers G, Byrne HJ, Lyng FM. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicology in vitro*. 2007;21:438-48.

76. Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin VA, Konduru NV, Potapovich AI, Osipov AN, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Mercer R, Castranova V, Shvedova AA. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron. *Toxicology letters*. 2006;165:88-100.
77. Vittorio O, Raffa V, Cuschieri A. Influence of purity and surface oxidation on cytotoxicity of multiwalled carbon nanotubes with human neuroblastoma cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2009;5:424-31.
78. Cui D, Tian F, Ozkan CS, Wang M, Gao H. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicology letters*. 2005;155:73-85.
79. Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, Wahl GM. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Molecular cell*. 2002;9:1031-44.
80. Pumera M, Miyahara Y. What amount of metallic impurities in carbon nanotubes is small enough not to dominate their redox properties?. *Nanoscale*. 2009;1:260-5.
81. Chen XH, Chen CS, Chen Q, Cheng FQ, Zhang G, Chen ZZ. Non-destructive purification of multi-walled carbon nanotubes produced by catalyzed CVD. *Materials Letters*. 2002;57:734-8.
82. Hou PX, Bai S, Yang QH, Liu C, Cheng HM. Multi-step purification of carbon nanotubes. *Carbon*. 2002;40:81-5.
83. Ge C, Li W, Li Y, Li B, Du J, Qiu Y, Liu Y, Gao Y, Chai Z, Chen C. Significance and systematic analysis of metallic impurities of carbon nanotubes produced by different manufacturers. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2011;11:2389-97.
84. Wörle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano letters*. 2006;6:1261-8.
85. Park EJ, Zahari NE, Lee EW, Song J, Lee JH, Cho MH, Kim JH. SWCNTs induced autophagic cell death in human bronchial epithelial cells. *Toxicology in Vitro*. 2014;28:442-50.
86. Liu HL, Zhang YL, Yang N, Zhang YX, Liu XQ, Li CG, Zhao Y, Wang YG, Zhang GG, Yang P, Guo F. A functionalized single-walled carbon nanotube-induced autophagic cell death in human lung cells through Akt–TSC2–mTOR signaling. *Cell death & disease*. 2011;2:e159.

87. Tabet L, Bussy C, Amara N, Setyan A, Grodet A, Rossi MJ, Pairon JC, Boczkowski J, Lanone S. Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2008;72:60-73.
88. Holt BD, Short PA, Rape AD, Wang YL, Islam MF, Dahl KN. Carbon nanotubes reorganize actin structures in cells and ex vivo. *ACS nano*. 2010;4:4872-8.
89. Kam NW, Liu Z, Dai H. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angewandte Chemie*. 2006;118:591-5.
90. Porter AE, Gass M, Muller K, Skepper JN, Midgley PA, Welland M. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. *Nature nanotechnology*. 2007;2:713-7.
91. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2005;16:577-86.
92. Jiang Y, Zhang H, Wang Y, Chen M, Ye S, Hou Z, Ren L. Modulation of apoptotic pathways of macrophages by surface-functionalized multi-walled carbon nanotubes. *PLoS One*. 2013;8:e65756.
93. Koehler BC, Scherr AL, Lorenz S, Urbanik T, Kautz N, Elssner C, Welte S, Bermejo JL, Jäger D, Schulze-Bergkamen H. Beyond cell death—antiapoptotic Bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. *PloS one*. 2013;8:e76446.
94. Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2009;486:95-102.
95. López-Oliva ME, Pozuelo MJ, Rotger R, Muñoz-Martínez E, Goni I. Grape antioxidant dietary fibre prevents mitochondrial apoptotic pathways by enhancing Bcl-2 and Bcl-xL expression and minimising oxidative stress in rat distal colonic mucosa. *British Journal of Nutrition*. 2013;109:4-16.
96. Hitoshi K, Katoh M, Suzuki T, Ando Y, Nadai M. Single-walled carbon nanotubes downregulate stress-responsive genes in human respiratory tract cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2012;35:455-63.

97. Wong YH, Abdul Kadir H. Induction of Mitochondria-Mediated Apoptosis in Ca Ski Human Cervical Cancer Cells Triggered by Mollic Acid Arabinoside Isolated from *Leea indica*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;684-740.
98. Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B: the enemy within. *Cancer cell*. 2004;6:203-8.
99. Uchida Y, Yamazaki H, Watanabe S, Hayakawa K, Meng Y, Hiramatsu N, Kasai A, Yamauchi K, Yao J, Kitamura M. Enhancement of NF- κ B activity by resveratrol in cytokine-exposed mesangial cells. *Clinical & Experimental Immunology*. 2005;142:76-83.
100. Prasad R, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit migration potential of pancreatic cancer cells by promoting mesenchymal-to-epithelial transition and targeting NF- κ B. *Cancer letters*. 2013;334:118-26.
101. Jia Z, Song Z, Zhao Y, Wang X, Liu P. Grape seed proanthocyanidin extract protects human lens epithelial cells from oxidative stress via reducing NF- κ B and MAPK protein expression. *Molecular vision*. 2011;17:210.
102. Snyder-Talkington BN, Pacurari M, Dong C, Leonard SS, Schwegler-Berry D, Castranova V, Qian Y, Guo NL. Systematic analysis of multiwalled carbon nanotube-induced cellular signaling and gene expression in human small airway epithelial cells. *toxicological sciences*. 2013;133:79-89.
103. Zheng Y, Liu Y, Ge J, Wang X, Liu L, Bu Z, Liu P. Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression. *Molecular Vision*. 2010;16:1467.
104. Sarkar S, Sharma C, Yog R, Periakaruppan A, Jejelowo O, Thomas R, Barrera EV, Rice-Ficht AC, Wilson BL, Ramesh GT. Analysis of stress responsive genes induced by single-walled carbon nanotubes in BJ Foreskin cells. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2007;7:584-92.

105. Lee JW, Choi YC, Kim R, Lee SK. Multiwall carbon nanotube-induced apoptosis and antioxidant gene expression in the gills, liver, and intestine of *Oryzias latipes*. *BioMed research international*. 2015;2015.
106. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008;294:L478-88.)
107. Park EJ, Pezzuto JM. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2015;1852:1071-113.
108. Yuan J, Gao H, Ching CB. Comparative protein profile of human hepatoma HepG2 cells treated with graphene and single-walled carbon nanotubes: an iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis. *Toxicology letters*. 2011;207:213-21.
109. Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinskyy N, Xiangmin Z, Olson S, Podlutzky A, Csiszar A. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;292:H2417-24.
110. Babich H, Schuck AG, Weisburg JH, Zuckerbraun HL. Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *Journal of toxicology*. 2011;2011.
111. Srđenović BU, Slavić MN, Stankov KM, Kladar NV, Jović DS, Seke MN, Bogdanović VV. Size distribution of fullerene nanoparticles in cell culture medium and their influence on antioxidative enzymes in Chinese hamster ovary cells. *Hemijska industrija*. 2015;69:425-31.
112. Guo YY, Zhang J, Zheng YF, Yang J, Zhu XQ. Cytotoxic and genotoxic effects of multi-wall carbon nanotubes on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2011;721:184-91.

113. Wang J, Sun P, Bao Y, Liu J, An L. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells. *Toxicology in vitro*. 2011;25:242-50.
114. Bo CH, Ying LI, SONG WM, Hayashi Y, DING XC, LI WH. In vitro evaluation of cytotoxicity and oxidative stress induced by multiwalled carbon nanotubes in murine RAW 264.7 macrophages and human A549 lung cells. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2011;24:593-601.
115. Guan J, Dai J, Zhao X, Liu C, Gao C, Liu R. Spectroscopic investigations on the interaction between carbon nanotubes and catalase on molecular level. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2014;28:211-6.
116. Sharma CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, Barr J, Wise K, Thomas R, Wilson BL, Ramesh GT. Single-walled carbon nanotubes induces oxidative stress in rat lung epithelial cells. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2007;7:2466-72.