

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ – БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На IX редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 14.7.2023. године, на основу молбе ментора, др Соње Ашкрабић, вишег научног сарадника Института за физику у Београду, и др Горана Брајушковића, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Мирјане П. Мићевић (рођене Милетић), истраживача - сарадника Института за физику у Београду, под насловом: „Ефекти наночестица CeO_2 и ZnO на туморске (HeLa) и нетрансформисане (MRC-5) хумане ћелије *in vitro* проучавани вибрационом спектроскопијом и микроскопијом на бази атомских сила“, у саставу:

1. др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет,
2. др Зорана Дохчевић-Митровић, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за физику у Београду, Институт од националног значаја за Републику Србију,
3. др Марко Даковић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Факултет за физичку хемију.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Мирјане П. Мићевић под називом „Ефекти наночестица CeO_2 и ZnO на туморске (HeLa) и нетрансформисане (MRC-5) хумане ћелије *in vitro* проучавани вибрационом спектроскопијом и микроскопијом на бази атомских сила“ написана је на укупно 153 нумерисане стране, које обухватају текст дисертације по поглављима, са списком литературе, прилозима и биографију аутора. Дисертација такође садржи следеће непагинисане целине: насловну страну на српском и енглеском језику, страну са подацима о менторима и члановима комисије, захвалницу, сажетак на српском и енглеском језику, листу скраћеница, садржај, Изјаву о ауторству, Изјаву о истовестности штампане и електронске верзије дисертације и Изјаву о коришћењу. Текст дисертације обухвата осам поглавља: Увод (18 страна), Циљеви рада (2 стране), Методе (30 страна), Резултати (55 страна), Дискусија (19 страна), Закључци (3 стране), Литература (23 стране) и Прилози (2 стране). Рад садржи 76 слика, од чега 10 у поглављу Увод, 10 у поглављу Методе, 54 у поглављу Резултати и 2 у Прилозима, затим 3 табеле у поглављу Резултати и 337 цитираних библиографских јединица.

Анализа докторске дисертације

Докторска дисертација „Ефекти наночестица CeO_2 и ZnO на туморске (HeLa) и нетрансформисане (MRC-5) хумане ћелије *in vitro* проучавани вибрационом спектроскопијом и микроскопијом на бази атомских сила“ је резултат оригиналног мултидисциплинарног истраживања, у ком су коришћене биолошке, физичкохемијске, физичке и математичке методе за проучавање биохемијских и морфолошких промена хуманих ћелија индукованих метал-оксидним наночестицама. У складу са насловом дисертације, централни део истраживања бави се анализом Раманових вибрационих спектра HeLa и MRC-5 ћелија третираних двома врстама наночестица CeO_2 и наночестицама ZnO , уз нешто мање обиман део посвећен анализи топографских слика и морфолошких параметара третираних ћелија добијених помоћу микроскопа на бази атомских сила.

Поглавље **Увод** је подељено на три основне тематске целине. Прва тематска целина садржи две подцелине, од којих се једна односи на наночестице CeO_2 , а друга на наночестице ZnO . Обе подцелине су подељене на по три подпоглавља, у којима су изложена основна физичкохемијска својства наночестица (прво подпоглавље) и механизми њихових интеракција са хуманим ћелијама (друго подпоглавље), уз посебан осврт на постојећа сазнања о ефектима на ћелијске линије коришћене у овој дисертацији: HeLa и MRC-5 ћелије (треће подпоглавље). Друга тематска целина се односи на примену Раманове спектроскопије у проучавању ћелија третираних наночестицама. Изложене су предности ове спектроскопске технике које је сврставају у технике са значајним потенцијалом за истраживање ефеката наночестица на ћелије, проучавањем информација које садржи ћелијски Раманов спектар, а дат је и литературни преглед претходних студија у којима је Раманова спектроскопија примењена на ћелијама третираним наночестицама. На аналоган начин, у трећој тематској целини су представљене могућности микроскопије на бази атомских сила (енгл. *atomic force microscopy*, AFM) у проучавању ћелија третираних наночестицама.

У поглављу **Циљеви рада** дефинисана су два општа циља који се остварују преко више специфичних подциљева. Први општи циљ је продубљивање сазнања о ефектима наночестица CeO_2 и ZnO на ћелије карцинома грлића материце (ћелијска линија HeLa) и неизмењене феталне фибробласте плућа (ћелијска линија MRC-5). За остваривање овог подциља предвиђено је коришћење стандардних биолошких метода, Раманове спектроскопије и AFM микроскопије. Специфични подциљ испитивања Рамановом спектроскопијом је утврђивање и дефинисање дозно-зависних промена интензитета и положаја Раманових модова у спектрима ћелија третираних наночестицама. Подциљеви испитивања AFM микроскопијом су добијање топографских слика и одређивање квантитативних морфолошких параметара преко којих се могу пратити промене у ћелијама индуковане наночестицама. Специфични подциљ испитивања стандардним биолошким методама је одређивање параметара цитотоксичности наночестица, али и корелисање биолошких промена ћелија индукованих наночестицама са променама у Рамановим спектрима и морфолошким параметрима третираних ћелија. Други основни циљ ове

дисертације је методолошке природе и подразумева допринос развоју Раманове спектроскопије као технике за проучавање ћелијских промена узрокованих наночестицама. Специфични подциљеви задати у оквиру овог општег циља су дефинисање промена у Рамановим спектрима које осликавају физиолошке и патолошке процесе у третираним ћелијама, идентификовање спектралних маркера заједничких за ћелије третиране различитим типовима наночестица, развој модела за класификацију различито третираних ћелија на основу ћелијских Раманових спектра и испитивање ефикасности више математичких метода у анализи ћелијских Раманових спектра.

У поглављу **Метод**е дате су укратко теоријске основе свих метода примењених у истраживању и детаљан опис експерименталних поставки. Поглавље је подељено на десет целина. Прва целина описује методе коришћене за синтезу и карактеризацију наночестица CeO_2 . Наночестице ZnO су комерцијалне па су подаци о њиховим карактеристикама били унапред познати. Наночестице CeO_2 синтетисане су на два начина, од којих један подразумева облагање наночестица декстраном. Карактерисане су рентгенском дифракцијом и методом динамичког расејања светлости. У другој целини описани су услови у којима су гајене HeLa и MRC-5 ћелије, а у трећој процедуре третирања ћелија наночестицама. Четврта целина даје експерименталне протоколе за припрему узорака наночестица и ћелија третираних наночестицама за снимање на електронском микроскопу (ТЕМ) и описује поставке уређаја коришћених за дата мерења. Ова техника је примењена у циљу одређивање величине и морфологије наночестица и потврде унутарћелијске локализације наночестица. Пета целина односи се на технику Рамановог мапирања, која је такође коришћена за потврду унутарћелијске локализације наночестица. Раманове мапе су прављене на основу једног спектралног региона који садржи искључиво Раманове модове типичне за ћелију и једног спектралног региона који садржи искључиво Раманов мод карактеристичан за наночестице. Шеста целина описује три коришћене стандардне биолошке методе за тестирање ћелијског раста и вијабилности: SRB (од енгл. *sulforhodamine B*, сулфородамин Б), МТТ и NRU (енгл. *neutral red*) тест. У седмој целини изложени су детаљи експеримента детекције апоптозе код ћелија третираних наночестицама, која је вршена на основу бојења анексином V и пропидијум јодидом и анализе бојених ћелија помоћу конфокалног флуоресцентног микроскопа. У осмој целини описана је проточна цитофлуориметрија ћелија рађена у циљу детекције промена у расподели фаза ћелијског циклуса изазваних наночестицама. Девета целина, посвећена вибрационој спектроскопији, је најобимнија и подељена је на пет подцелина. У првој подцелини изложена је теоријска основа вибрационе спектроскопије. Описан је феномен молекулских вибрација и дате су основне једначине класичне и квантне механике које описују вибрациона кретања молекула. Укратко су представљене основне методе вибрационе спектроскопије, а детаљније је изложена физичка основа Раманове вибрационе спектроскопије. У другој подцелини је описана експериментална поставка при мерењу Раманових спектра ћелија на два различита уређаја, од којих је један комерцијални, а други некомерцијални и посебно прилагођен за брза мерења великог броја ћелијских спектра. У оба случаја за побуду је коришћена ласерска линија таласне дужине 532 nm. Обрађивана су и анализирана два спектрална региона: $(600-1800) \text{ cm}^{-1}$ код некомерцијалног, односно $(700-1800) \text{ cm}^{-1}$ код комерцијалног система (означен као нискофреквентни регион) и $(2600-3200)$

cm^{-1} код некомерцијалног, односно (2700-3600) cm^{-1} код комерцијалног система (означен као високофреквентни регион). Трећа подцелина детаљно описује процес обраде Раманових спектра, рађен у програму *R* помоћу функција пакета *hyperSpec*. Обрада је подразумевала уклањање нежељеног доприноса космичког зрачења, калибрацију таласног броја и интензитета спектра, интерполацију, уклањање позадинског сигнала и нормирање интензитета. У четвртој подцелини описане су две методе коришћене за одређивање интензитета Раманових модова у усредњеним спектрима ћелија, док је пета подцелина посвећена методама мултиваријантне статистике коришћеним за анализу ћелијских Раманових спектра. Овде је образложена потреба за мултиваријантним типом анализе ћелијских спектра и објашњене су теоријске основе метода PCA (од енгл. *principal component analysis*, анализа главних компоненти) и PLS-LDA (од енгл. *partial least squares*, парцијална регресија методом најмањих квадрата, и *linear discriminant analysis*, линеарна дискриминациона анализа), коришћене за детекцију промена у ћелијским спектрима изазваним наночестицама, односно за изградњу модела за калсификацију ћелијских Раманових спектра. Последња целина поглавља Методе посвећена је AFM микроскопији. У њему су изложени основни принципи и режими рада AFM микроскопа и детаљи експерименталне поставке коришћени при мерењу ћелија у полуконтактном режиму, као и припреме ћелија која је претходила мерењу.

Поглавље **Резултати** подељено је на шест целина. У првој целини изложени су резултати карактеризације синтетисаних наночестица. Код обе врсте наночестица потврђена је кристална структура карактеристична за CeO_2 што потврђује успешност синтезе. Утврђено је да наночестице обложене декстраном одликује знатно већа стабилност у воденом раствору него необложене наночестице, које под истим условима формирају крупне агрегате. У другој целини приказане су Раманове мапе добијене на различитим дубинама HeLa ћелија третираним наночестицама CeO_2 , које показују присуство наночестица у унутрашњости ћелија. Присуство кластера наночестица се може уочити и на приказаним ТЕМ микрографијама третираних ћелија. У трећој целини приказани су резултати испитивања раста и вијабилности HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO_2 коришћењем стандардних биолошких метода. Најпре су графички приказани резултати SRB теста на основу којих су одређене оптималне дозе CeO_2 и време инкубације за третирање HeLa и MRC-5 ћелија у експериментима Раманове спектроскопије. Резултати за две врсте наночестица CeO_2 су приказани паралелно, тако да се са графикана може јасно уочити да облагање декстраном значајно повећава цитотоксичност наночестица. Затим следе резултати МТТ теста за оба типа ћелија третираних необложеним и декстраном обложеним наночестицама CeO_2 , у којима је пад метаболичке активности третираних ћелија изражен процентуално у односу на нетретирану контролу. Графички приказ ових резултата такође омогућава лако уочавање значајно већег пада метаболичке активности HeLa и MRC-5 ћелија третираних обложеним наночестицама. Последњи део треће целине поглавља Резултати односи се на испитивање ефеката наночестица CeO_2 на индукцију апоптозе код HeLa и MRC-5 ћелија. Приказане су слике третираних ћелија добијене помоћу конфокалног флуоресцентног микроскопа. Захваљујући флуоресценцији анексина и пропидијум јодида којима су ћелије бојене, на сликама се визуелно уочавају дозно-зависне разлике у ефектима наночестица на ћелије. Промене у проценту ћелија у раној и касној апоптози/некрози

квантификоване су у односу на контролу и графички представљене уз одговарајуће микроскопске слике. Процент HeLa и MRC-5 ћелија у касној апоптози/некрози изразито расте након третмана наночестицама обложеним декстраном. Четврта целина поглавља Резултати представља резултате испитивања ефеката наночестица ZnO на HeLa и MRC-5 ћелије стандардним биолошким методама. Ова целина је конципирана по аналогији са претходном. Сви резултати приказани су компаративно за HeLa и MRC-5 ћелије и сагласни су у погледу веће осетљивости MRC-5 него HeLa ћелија на наночестице ZnO. За овај тип наночестица додатно је испитиван утицај на ћелијски циклус, међутим, изложени резултати не показују значајне промене у расподели фаза ћелијског циклуса код третираних у односу на контролне HeLa и MRC-5 ћелије. Пета целина поглавља Резултати обухвата резултате експеримената Раманове спектроскопије, односно анализе ћелијских Раманових спектра. Ова целина подељена је на пет подцелина. Прве три подцелине представљају резултате три сета експеримената: 1) Раманове спектроскопије HeLa ћелија третираних наночестицама CeO_2 , 2) Раманове спектроскопије MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO_2 и 3) јединственог експеримента Раманове спектроскопије HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO. У четвртој подцелини изнети су резултати моделовања заједничких промена у Рамановим спектрима MRC-5 ћелија третираним различитим типовима и дозама метал-оксидних наночестица. У петој подцелини дата је табела са детаљним пописом више од 80 регистрованих ћелијских Раманових модова чији се интензитет након третмана наночестицама променио. За сваки мод у табели је на основу литературних података назначена претпостављена асигнација (повезаност са вибрацијом одређене атомске групе или конкретне класе ћелијских макромолекула) и наведено при ком типу третмана и у којој ћелијској линији је промена интензитета мода регистрована. Резултати Раманове спектроскопије HeLa ћелија третираних необложеним и декстраном обложеним наночестицама CeO_2 који су први изложени одликују се високом статистичком поузданошћу, будући да је за сваку ћелијску групу измерено по неколико стотина ћелија. Приказани су резултати заједничке PCA анализе нискофреквентног и високофреквентног региона Раманових спектра контролних и третираних ћелија. Резултати обухватају графикон скорова прве три PC компоненте, на ком се уочава да су компоненте PC1 и PC3 значајне за раздвајање третираних од контролних HeLa ћелија, и графикон који приказује саме PC компоненте (тј. векторе оптерећења), на којима су означене фреквенције ћелијских Раманових модова који су интензитетски промењени у одговору на третман наночестицама. Обе врсте наночестица CeO_2 највише утичу на смањење интензитета Раманових модова повезаних са нуклеинским киселинама. Најупечатљивије разлике између ћелија третираних двама типовима наночестица односе се на Раманове модове осетљиве на промене у секундарној структури протеина. Полазећи од PC компонената из ове анализе, направљен је и графички представљен PLS-LDA модел за класификацију ћелијских Раманових спектра. Модел је показао висок ниво специфичности и сензитивности у одређивању припадности тестираних спектра једној од три класе (ћелије третиране необложеним CeO_2 , ћелије третиране обложеним CeO_2 и контролне ћелије). Резултати анализе Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO_2 приказани су у основи на исти начин као и код HeLa ћелија, с тим што су у овом случају нискофреквентни и високофреквентни регион анализирани засебно. Овај сет мерења изведен је у другачијој

експерименталној поставци, која је омогућила бољи однос сигнал/шум у самим спектрима и у РС компонентама добијеним њиховом анализом. То је резултирало детекцијом специфичнијих промена у Рамановим спектрима MRC-5 ћелија третираних декстраном обложеним наночестицама CeO_2 , као што је смањење интензитета Рамановог мода на 813 cm^{-1} , повезаног са молекулом РНК, и повећање интензитета Раманових маркера незасићености липида. Испитивани су ефекти по две дозе необложених и декстраном обложених CeO_2 наночестица. Међутим, промене у спектрима MRC-5 ћелија третираним необложеним наночестицама нису уочене док није примењена PCA анализа „по паровима“. Ради се о нешто другачијем приступу PCA анализи Раманових спектра чија је ефикасност у детекцији разлика узрокованим различитим врстама и дозама наночестица CeO_2 показана кроз овај сет експеримената. Резултати анализе по паровима приказани су по аналогији са претходно изложеним резултатима, преко графикана РС скорова и вектора оптерећења. Одвојено су приказани резултати четири анализе: нискофреквентног, а затим високофреквентног спектралног региона MRC-5 ћелија третираних необложеним, односно декстраном обложеним наночестицама CeO_2 . Поређењем релативних интензитета пикова РС1 компоненти добијених у различитим анализама утврђено је да промене у маркерима незасићености липида карактеришу ниже цитотоксичне дозе наночестица обложених декстраном, док је код високо цитотоксичних доза истих наночестица показано смањење интензитета Рамановог маркера РНК. Резултати анализе спектра ћелија третираних необложеним наночестицама CeO_2 показују да се на основу компоненте РС1 ћелије третиране нижом дозом наночестица могу раздвојити од контроле, што не важи за ћелије третиране вишом дозом истих наночестица. Резултати анализе високофреквентног спектралног региона недвосмислено су показали повећање односа садржаја липида и протеина код MRC-5 ћелија третираних обема врстама CeO_2 , али дозно-зависне разлике нису установљене. У анализи Раманових спектра HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO коришћена је нестандартна варијанта PCA, ненегативна PCA. Резултати ове експерименталне целине обухватају: ненегативну PCA Раманових спектра HeLa ћелија третираних двама дозама наночестица ZnO и контролних ћелија, у нискофреквентном региону; ненегативну PCA анализу спектра MRC-5 ћелија третираних трима дозама наночестица ZnO и контролних ћелија, у нискофреквентном региону; две аналогне анализе високофреквентног региона; ненегативну PCA анализу парова MRC-5 ћелијских спектра (контролне ћелије са ћелијама третираним сваком од доза ZnO засебно). У истој целини приказани су и резултати PCA анализе Раманових спектра контролних HeLa и MRC-5 ћелија, као и графикони на којима су РС компоненте добијене анализом ћелијских спектра упоређене са Рамановим спектрима фосфатидилсерина, стеаринске и олеинске киселине. Сумирано, резултати овог сета експеримената показују да се Раманови спектри HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO разликују од контроле у низу модова нуклеинских киселина, липида и протеина, а да се разлике међу спектрима ћелија третираних различитим дозама осликавају најупечатљивије преко разлика у односима интензитета I_{1270}/I_{1300} , I_{1657}/I_{1440} и I_{1067}/I_{1743} . Осим PCA анализе, у резултатима су приказане и промене у интензитету неколико Раманових модова у усредњеним ћелијским спектрима, који су предложени за Раманове маркере цитотоксичног ефекта наночестица ZnO на HeLa и MRC-5 ћелије. Резултати заједничке анализе ефеката наночестица CeO_2 и ZnO на Раманове

спектре MRC-5 ћелија приказани су у две целине. Прву целину чини графички приказ корелације односа интензитета пикова I_{1270}/I_{1300} у PC1 са процентом метаболичке активности одређеним помоћу MTT теста, за ћелије третиране различитим врстама и дозама наночестица. Другу целину чини PLS-LDA модел за класификацију MRC-5 ћелија третираних различитим врстама и дозама наночестица, са графиком LD скорова од значаја за раздвајање ћелија и табелом која показује тачност, сензитивност и специфичност модела при класификовању ћелијских спектра. Тестирање модела је показало високу успешност у класификовању највише и најмање оштећених ћелија, док су умерено оштећене ћелије класификоване са нешто слабијим успехом. Последња велика целина поглавља Резултати садржи резултате проучавања ефеката наночестица CeO_2 и ZnO на HeLa ћелије AFM микроскопијом. Подељена је на две подцелине у којима су засебно приказани резултати за два типа метал-оксидних наночестица. У првој подцелини приказане су 2D и 3D топографије HeLa ћелија третираних необложеним и декстраном обложеним наночестицама CeO_2 , као и слике добијене на основу промене амплитуде осцилације гредице AFM микроскопа. На сликама се могу видети промене у морфологији ћелијске мембране и њених протрузија, једра и једарцета третираних ћелија у односу на контролне ћелије, чије су AFM слике упоредо приказане. Након описа ћелијске морфологије, графички су приказане промене два квантитативна параметра: висине ћелије и површинске храпавости, код третираних у односу на контролне ћелије. У другој подцелини целине посвећене резултатима AFM микроскопије приказане су топографске слике HeLa ћелија третираних наночестицама ZnO . Због хетерогености ћелијске морфологије у узорку, на сликама су приказана два најзаступљенија општа типа третираних ћелија, описана као издужене и заокругљене ћелије. На крају целине, повећање површинске храпавости HeLa ћелија након третмана наночестицама ZnO описано је и графички представљено.

Текст поглавља **Дискусија** прати редослед резултата изложених у претходном поглављу, образлажући их, повезујући их у смисаону целину у складу са циљевима рада и тумачећи их у светлу литературних података. Уводни део Дискусије подсећа на важност испитивања ефеката метал-оксидних наночестица на ћелије човека, с обзиром на велики потенцијал примене ових наночестица на различитим пољима. Прва велика целина обухвата дискусију стандардних биолошких метода којима су проучавани ефекти наночестица CeO_2 и ZnO на HeLa и MRC-5 ћелије. Овде је скренута пажња да је један од циљева примене описаних биолошких метода био боље разумевање измерених ћелијских Раманових спектра и AFM топографских слика. Ова сврха се показала оправданом, што се може видети честим освртима на резултате биолошких метода током дискутовања резултата Раманове спектроскопије и AFM осликавања. У првој целини, објашњава се на који начин су резултати SRB теста определили оптималне дозе наночестица и време инкубације за коришћење у другим експериментима. У дискусији резултата MTT теста HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO_2 скреће се пажња на регистрован пораст метаболичке активности при нижим и пад метаболичке активности при вишим дозама наночестица. Понуђена објашњења овог феномена се базирају на штетности превисоке антиоксидативне активности CeO_2 и померању равнотеже између различитих механизма деловања наночестица CeO_2 у ћелији. Затим се објашњавају претпостављени узроци ниске цитотоксичности необложених CeO_2 наночестица, повезани са смањеним односом

површине и запремине у крупним агломератима које ове наночестице граде. Следи осврт на разлике у резултатима тестова SRB и МТТ, где се већа осетљивост МТТ теста на промене изазване наночестицама повезује са индукцијом апоптозе унутрашњим (митохондријалним) путем, узрокованом наночестицама CeO_2 . Затим су изнета запажања о дозно-зависном повећању утицаја декстраном обложених наночестица CeO_2 на индукцију апоптозе израженијем код HeLa него код MRC-5 ћелија. Испитивање ефеката наночестица ZnO на HeLa и MRC-5 ћелије биолошким методама дало је усаглашене резултате који указују на високу цитотоксичност ових наночестица, израженију код MRC-5 него код HeLa ћелија. Скренута је пажња на дозе ZnO које су довеле до индукције апоптозе код третираних ћелија, што је од значаја за тумачење промена у ћелијским Рамановим спектрима. Друга велика целина Дискусије обухвата дискусију резултата Раманове спектроскопије ћелија третираних наночестицама. Као увод у ову тематску целину, даје се кратак преглед свих изведених Раманових експеримената и приступа коришћених при анализи резултата. Резултати Раманове спектроскопије HeLa ћелија третираних наночестицама CeO_2 дискутују се прво преко промена интензитета Раманових модова у усредњеним спектрима ћелија, а потом се указује на чињеницу да, због комплексности ћелијских Раманових спектра, поузданије методе њихове анализе пружа мултиваријантна статистика. У дискусији резултата PCA анализе указује се на пад садржаја нуклеинских киселина изражен код HeLa ћелија третираних обема врстама наночестица CeO_2 и објашњава зашто се детектоване промене не могу приписати искључиво ДНК или РНК молекулама. Детаљно се дискутују промене у амидним тракама Раманових спектра третираних ћелија. Истичу се протеински модови који могу бити и липидног порекла и заједно са модовима високфреквентног спектралног региона указују на пораст липидног садржаја у третираним ћелијама. Детектоване промене које указују на промену садржаја макромолекула у ћелији повезују се са процесима оксидативног стреса и ћелијске смрти: деградацијом и фрагментацијом ДНК, смањењем синтезе РНК и агрегацијом протеина. Коментаришу се параметри који показују успешност класификације ћелијских спектра PLS-LDA моделом. У сету експеримената на MRC-5 ћелијама третираним наночестицама CeO_2 анализирани су ефекти по две дозе необложених и обложених наночестица CeO_2 , те су дискутоване дозно-зависне разлике у Рамановим спектрима. Код ћелија третираних обложеним наночестицама дозно-зависне разлике се уочавају анализом усредњених спектра и PCA анализом. Код ћелија третираних необложеним CeO_2 правилност дозно-зависних спектралних промена је нарушена, што је кроз дискусију повезано са додатним ефектима велике концентрације крупних агломерата наночестица и могућим артефактима мерења. Дозно-зависне промене маркера незасићености липида, фосфатидилсерина и молекула РНК детаљно су тумачени уз помоћ резултата биолошких тестова и литературних података. Промена у заступљености различитих мембранских структура (мембранских протрузија, ендозома, лизозома, апоптотских тела, липидних капи), екстернализација фосфатидилсерина у раној фази апоптозе, висока подложност незасићених липида оксидативним оштећењима су фактори који су у Дискусији ове дисертације повезани са променама у липидним Рамановим модовима ћелијских спектра. У делу овог поглавља који се бави утицајем наночестица ZnO на ћелијске Раманове спектре, дозно-зависни ефекат наночестица на ћелије HeLa и MRC-5 се дискутује паралелно, узимајући у обзир разлику у осетљивости ових ћелијских линија на

ZnO. Као и у случају наночестица CeO_2 , и овде се промене интензитета маркера незасићених липида и фосфатидилсерина повезују са фазама апоптозе и дискутују у оквирима резултата добијених биолошким методама. Дискутују се затим уочене разлике у Рамановим спектрима нетретираних HeLa и MRC-5 ћелија, које сугеришу да већи удео незасићених липида код MRC-5 ћелија може бити разлог за већу осетљивост ових ћелија на наночестице ZnO. Посебна пажња се поклања дискутовању промена интензитета пикова I_{1270}/I_{1300} и повезаности његове вредности са степеном оштећења ћелија третираних различитим врстама и дозама наночестица. Наглашава се потреба за проширивањем испитивања на што већи број типова ћелија и наночестица, како би се подробније испитале промене у параметру I_{1270}/I_{1300} и читавој липидној компоненти Раманових спектра третираних ћелија. Кандидаткиња закључује да би овакве студије могле допринети развоју Раманове спектроскопије као методе за анализу ћелијског липида, али и нових тестова за испитивање цитотоксичности наночестица и других агенаса. Трећа велика целина Дискусије бави се морфолошким променама третираних ћелија регистрованих помоћу AFM-а. Детаљно се описују топографске слике контролних и третираних ћелија. Промене узроковане третманом које се запажају на нивоу ћелијске мембране доводе се у везу са ендцитозом наночестица, оштећењем ћелијске мембране и формирањем апоптотских тела. Промене запажене на нивоу једра и једарцета повезују се са нарушавањем метаболичке активности ћелија, деградацијом хроматина, једарне овојнице и ламина и активношћу ћелијских нуклеаза и протеаза. Осим тога што су у складу са резултатима добијеним биолошким методама, кандидаткиња показује и да су морфолошке промене уочене AFM-ом у складу са променама детектованим Рамановом спектроскопијом и да се међусобно боље објашњавају. Дискутована је површинска храпавост ћелије као квантитативни параметар који расте након третмана свим врстама наночестица коришћеним у овој студији. Висина ћелије, као други морфолошки квантитативни параметар, описана је као проблематичан, али у неким случајевима користан параметар. Код ћелија третираних необложеним наночестицама CeO_2 није било могуће поуздано одредити површинску храпавост, али значајно смањење просечне висине ћелије је показало да су ове наночестице, иако слабо цитотоксичне, оствариле изванредан ефекат на ћелије. Два различита типа морфологије HeLa ћелија третираних наночестицама ZnO прокоментарисана су као резултат различитих стадијума апоптозе у којима се ћелије налазе, али ни постојање других модалитета или комбинација модалитета ћелијске смрти није искључено. HeLa ћелије третиране наночестицама ZnO кандидаткиња је искористила као пример за негативан ефекат фиксације ћелија на AFM мерења и указала на потребу за мерењима на живим ћелијама. Дискусија се завршава сумирањем свих резултата и закључака, у дескриптивнијем виду него што ће бити случај у поглављу Закључци. Обимност изведених експеримената и анализа, као и мноштво параметара који су праћени различитим методама, оправдава овакав поступак кандидаткиње.

У поглављу **Закључци** сумирани су резултати истраживања и закључци који су из њих проистекли. Први део поглавља садржи закључке о ефектима наночестица CeO_2 и ZnO на HeLa и MRC-5 ћелије. За сваку од шест комбинација два типа ћелија и три типа наночестица (HeLa/MRC-5 ћелије, необложене CeO_2 /обложене CeO_2/ZnO наночестице) концизно су сумирани закључци о променама у расту, вијабилности, индукцији апоптозе, биохемијском

саставу и морфолошким карактеристикама, произашли из свих метода примењених у раду. Поред тога, наведени су закључци о утицају облагања наночестица CeO_2 на цитотоксичност, већој осетљивости MRC-5 ћелија на наночестице ZnO и утицају наночестица CeO_2 и ZnO на митохондријалну активност. Други део поглавља садржи закључке који се тичу примене Раманове спектроскопије и AFM микроскопије у проучавању ефеката наночестица на ћелије. Њима су истакнути потенцијално корисни параметри за праћење ефеката наночестица на ћелије Рамановом спектроскопијом, у које спадају пад интензитета модова нуклеинских киселина и пораст односа интензитета пикова I_{-2850}/I_{-2930} у Рамановим спектрима третираних ћелија. Два параграфа се односе на однос интензитета I_{-1270}/I_{-1300} , који представља маркер незасићености липида. Овај однос се може пратити помоћу РСА анализе и повезан је са фазом ћелијске смрти. Од фазе ћелијске смрти зависи и појава Раманових маркера фосфатидилсерина у ћелијским спектрима, до чега се такође долази РСА анализом. Истиче се закључак да се РСА анализом Раманових спектра могу детектовати промене у типу, уређености и дужини ланаца фосфолипида који улазе у састав ћелија и мењају се под утицајем наночестица. Даје се закључак о корисности и недостацима високофреквентног спектралног региона при проучавању промена ћелија узрокованих наночестицама. Закључује се да најкомплетнију анализу дозно-зависних промена у Рамановим спектрима ћелија третираних наночестицама омогућава комбиновање више различитих математичких приступа у анализи, као и да је ненегативна РСА, нестандардна варијанта ове методе, посебно погодна за анализу ћелијских спектра. Последњи параграфи се односе на AFM микроскопију. Наводе се морфолошке карактеристике третираних ћелија које се могу пратити на AFM сликама и поузданост површинске храпавости ћелија као квантитативног параметра који расте након третмана наночестицама. Закључује се да су крупни кластери наночестица, као и хемијска фиксација ћелија, потенцијално ометајући фактори за примену ове методе у проучавању ефеката наночестица на ћелије.

У поглављу **Литература** је приказано 337 библиографских јединица које су на адекватан начин цитиране у тексту дисертације.

Провера оригиналности докторске дисертације

На основу извештаја који је добијен провером оригиналности докторске дисертације Мирјане П. Мићевић под насловом „Ефекти наночестица CeO_2 и ZnO на туморске (HeLa) и нетрансформисане (MRC-5) хумане ћелије *in vitro* проучавани вибрационом спектроскопијом и микроскопијом на бази атомских сила“ израчунат је индекс сличности који износи 3%. Увидом у извештај утврђено је да је процењен степен подударности последица тзв. општих места и података, стручних термина и израза, мерних јединица, ознака хемијских једињења, формула, позивања на слике и табеле и библиографских података о коришћеној литератури, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, извештај

указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Miletić M**, Aškračić S, Rüger J, Vasić B, Korićanac L, Mondol AS, Dellith J, Popp J, Schie I, Dohčević-Mitrović Z. Combined Raman and AFM detection of changes in HeLa cervical cancer cells induced by CeO₂ nanoparticles – molecular and morphological perspective. *Analyst*. 2020; 145:3983-3995. doi: <https://doi.org/10.1039/C9AN02518A>. (IF2020=4.616) M21
2. **Miletić M**, Vilotić A, Korićanac L, Žakula J, Jovanović Krivokuća M, Dohčević-Mitrović Z, Aškračić S. Spectroscopic signature of ZnO NP-induced cell death modalities assessed by non-negative PCA. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2023;288:122180. doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.122180>. (IF2022=4.4) M21

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Miletić M**, Aškračić S, Schie I, Rüger J, Korićanac L, Mondol AS, Vasić B, Dohčević-Mitrović Z. Effects of cerium-dioxide nanoparticles in cervical cancer cells studied by Raman spectroscopy. VII International School and Conference on Photonics – PHOTONICA 2019. Book of abstracts: 132. Belgrade, Serbia. 26-30. August 2019. http://www.photonica.ac.rs/docs/PHOTONICA2019-Book_of_abstracts.pdf M34
2. **Miletić M**, Aškračić S, Vilotić A, Jovanović Krivokuća M, Korićanac L, Žakula J, Dohčević-Mitrović Z. Lipid content changes in cancerous and non-cancerous cells induced by ZnO nanoparticles: Raman spectroscopy approach. The 11th Conference of the Balkan Physical Union (BPU11 Congress), The Book of Abstracts: 235-236. Belgrade, Serbia. 28 August-1 September 2022. <https://indico.bpu11.info/event/1/book-of-abstracts.pdf> M34
3. **Miletić M**, Aškračić S. Non-supervised algorithms for Raman spectral decomposition in the in-vitro study of oxide nanoparticles effects on human cells. The 11th Conference of the Balkan Physical Union (BPU11 Congress). The Book of Abstracts: 220-221. Belgrade, Serbia. 28 August-1 September 2022. <https://indico.bpu11.info/event/1/book-of-abstracts.pdf> M34

Мишљење и предлог комисије

Докторска дисертација Мирјане П. Мићевић представља оригинални научно-истраживачки допринос научним областима примене Раманове спектроскопије и микроскопије на бази атомских сила у испитивању хуманих ћелија. Кандидаткиња је циљеве дисертације реализовала применом метода различитих научних дисциплина, од биолошких, преко физичкохемијских до физичких и анализом резултата разноврсним методама мултиваријантне математичке статистике. Значајан допринос ове дисертације је издвајање вибрационих маркера цитотоксичног утицаја метал-оксидних наночестица на хумане ћелија као и свеобухватна компаративна анализа утицаја два типа наночестица на биомолекуларни састав и морфологију туморских и неизмењених хуманих ћелија.

Резултати ове дисертације су објављени у два научна рада (категорије M21) у којима је кандидаткиња први аутор. Начин на који су резултати представљени и дискутовани у дисертацији показује висок степен развијености научног критичког размишљања кандидаткиње.

На основу наведеног именована Комисија предлаже Наставно-Научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње **Мирјане П. Мићевић** (рођене **Милетић**) под насловом: **„Ефекти наночестица CeO_2 и ZnO на туморске (HeLa) и нетрансформисане (MRC-5) хумане ћелије *in vitro* проучавани вибрационом спектроскопијом и микроскопијом на бази атомских сила“** и омогући кандидаткињи јавну одбрану дисертације.

У Београду, 14.7.2023. године

КОМИСИЈА:

др Душанка Савић-Павићевић
редовни професор
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Зорана Дохчевић-Митровић
научни саветник
Универзитет у Београду – Институт за физику у Београду, Институт од
националног значаја за Републику Србију

др Марко Даковић
ванредни професор
Универзитет у Београду – Факултет за физичку хемију