

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 19.03.2015. godine, broj 4600/13, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Mehanizmi citotoksi nog i citoprotektivnog dejstva fullerenskih (C₆₀) nano estica“

kandidata dipl. molekularnog biologa i fiziologa Misirki Marjanovi . Mentor doktorske disertacije je prof. dr Vladimir Trajkovi .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Aleksandra Isakovi , Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Nau ni sav. dr Zoran Markovi , Institut za nuklearne nauke Vin a, Univerzitet u Beogradu
3. Doc. dr Vladislav Volarevi , Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija Maje Misirki Marjanovi pod nazivom „Mehanizmi citotoksi nog i citoprotektivnog dejstva fullerenskih (C₆₀) nano estica” napisana je na 79 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 25 priloga. U poslednjem

poglavlju je iznet pregled literature koja je citirana u doktorskoj disertaciji i sadrži 99 navoda. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korištenih u tekstu. Struktura i kompozicija rada u celini sadrži sve elemente i zadovoljava sve kriterijume doktorske disertacije.

U **Uvodu** je ukratko opisano otkriće fullerenskog molekula za koje su fizičari Robert Curl i Richard Smalley 1996. god. dobili Nobelovu nagradu, kao i eksperimentalna metoda koja je omogućila proizvodnju većih količina ovog molekula, ime je omogućeno njihovo ispitivanje u nizu naučnih oblasti. Opisana je struktura fullerenskog kaveza koja uslovljava specifične fizičko-hemijske osobine fulerena, sa jedne strane antioksidativna svojstva, a sa druge izraženu sposobnost da generiše reaktivne kiseonikne vrste (RKV) u prisustvu vidljive svetlosti. Opisane su metode za rastvaranje fulerena u vodi, a posebna pažnja je posvećena njihovom uticaju na antioksidativna/prooksidativna svojstva fullerenskih nanostruktura. Uvodni deo se takođe bavi nastankom i reaktivnošću u singlet kiseonika i superoksid anjona, najznačajnijih RKV koje proizvode fulereni, kao i oksidativnim stresom uopšte. Mitohondrije su ćelijske organele koje su veoma osetljive na oksidativni stres, ali istovremeno i mesto intenzivne produkcije RKV. Osim toga, depolarizacija i narušavanje integriteta mitohondrijalne membrane u osnovi su kako apoptotične tako i nekrotične ćelijske smrti, što je detaljno opisano u poslednjem delu uvoda.

Imaju se u vidu da ne postoji dovoljno podataka o vezi između različitih načina pripreme fullerenskih nanostruktura (nC_{60}) i njihovog pro- ili antioksidativnog dejstva, odnosno uticaja na vijabilnost ćelija, postavljene su sledeće **Ciljevi** ovog istraživanja: (1) Ispitati kako različiti načini pripreme nC_{60} (izmena rastvarača i oblaganje surfaktantima) utiču na sposobnost fullerenskih nanostruktura da indukuju, odnosno spreče oksidativni stres i ćelijsku smrt. (2) Utvrditi biološke i fizičko-hemijske mehanizme odgovorne za prooksidativno i citotoksično dejstvo nC_{60} pripremljenih različitim metodama. (3) Utvrditi biološke i fizičko-hemijske mehanizme odgovorne za antioksidativno i citoprotektivno dejstvo nC_{60} pripremljenih različitim metodama.

U poglavlju **Materijal i metode** kandidat detaljno opisuje eksperimentalne metode i uslove pod kojima su eksperimenti izvedeni: a) priprema nC_{60} metodom zamene rastvara a i mehanohemijskim putem, kao i njihova karakterizacija; b) gajenje humanih keratinocita NTCC 2544, humanih fibroblasta NHDF, elijske linije pacovskog glioma C6, mišjeg fibrosarkoma L929 i mišjeg melanoma B16; c) tretiranje elija rastvorima različitih fullerenskih preparata u prisustvu ili odsustvu donora azot monoksida i antioksidanata; d) određivanje vijabilnosti elija merenjem aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze, određivanje broja adherentnih elija nakon bojenja kristal violetom, odnosno citotoksičnosti merenjem aktivnosti laktat dehidrogenaze; e) analize na prototipnom citofluorimetru za detekciju apoptoze i nekroze (eksternalizacija fosfatidilserina i fragmentacija DNK), aktivacije kaspaza i određivanje membranskog potencijala mitohondrija; f) određivanje nivoa lipidne peroksidacije kolorimetrijskom metodom; g) merenje totalne produkcije RKV, kao i produkcije superoksid anjona i azot monoksida prototipnom citofluorimetrijom, fluorimetrijskom ili kolorimetrijskom metodom. Konačno, teorijskom i statističkom analizom eksperimentalnih rezultata su potpuno razjašnjeni mehanizmi elijske smrti koju izazivaju nano estice fulerena.

Rezultati su jasno prikazani u vidu 25 priloga (slika) uz prpratni tekst, koji sadržaj u potpunosti odgovara sadržaju priloga.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, i u ovom poglavlju je kandidat na sveobuhvatan i detaljan način analizirao podatke drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada i koji su potpuno u skladu sa dobijenim rezultatima i navedenim ciljevima istraživanja.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U poglavlju **Rezultati** kandidat jasno i dokumentovano prikazuje dobijene eksperimentalne podatke o uticaju korišćenja različitih metoda za pripremu nC_{60} na njihove pro-oksidativne i antioksidativne efekte. Nakon pripreme nC_{60} metodom izmene rastvarača, izvršena je njihova karakterizacija. Utvrđena je kristalna struktura novonastalih estica, kao i njihova prosečna veličina. UV-Vis apsorpcioni spektri nano estica pripremljenih sa tetrahidrofuranom (THF/ nC_{60}) i etanolom (EtOH/ nC_{60}) su bili tipični za C_{60} , dok su kod nano estica pripremljenih mešanjem u vodi (H_2O/nC_{60}) bili skoro neprimetni, što je objašnjeno veoma niskom koncentracijom H_2O/nC_{60} u rastvoru. Zatim je ispitana citotoksičnost nC_{60} na humanim keratinocitima NTCC i utvrđeno je da je THF/ nC_{60} doveo do značajnog smanjenja broja ćelija, dok su druga dva preparata ispoljila blagu toksičnost. Ovaj rezultat je potvrđen i na humanim fibroblastima NHDF, mišjem fibrosarkomu L929 i mišjem melanomu B16. Dalje, pokazano je da THF/ nC_{60} izaziva nekrotični tip ćelijske smrti koji je najverovatnije posredovan smanjenjem membranskog potencijala mitohondrija. Utvrđeno je da THF/ nC_{60} produkuje više RKV od EtOH/ nC_{60} i H_2O/nC_{60} . U skladu sa tim, teorijska analiza RKV produkcije nC_{60} pokazala je da je efikasnost THF/ nC_{60} u proizvodnji singlet kiseonika veća u odnosu na druga dva preparata. Upotreba antioksidanta N-acetil cisteina, koji je doveo do oporavka ćelija tretiranih sa THF/ nC_{60} , ukazala je na ključnu ulogu RKV u citotoksičnom delovanju ovog fullerenskog preparata. Da bi se ispitala uloga rastvarača u citotoksičnosti THF/ nC_{60} , nano estice su ozračene zračenjem. Molekul THF-a je bio degradiran zračenjem, što je uzrokovalo smanjenje toksičnih efekata ovog nanokristala, odnosno ukazalo na bitnu ulogu organskog rastvarača u citotoksičnosti THF/ nC_{60} .

U drugom delu rezultata ispitivane su osobine mehanohemijski pripremljenih nC_{60} . Prvo je izvršena karakterizacija mehanohemijski pripremljenih nC_{60} kompleksa sa natrijum dodecil sulfatom ($C_{60}SDS$), β -ciklodekstrinom ($C_{60}CDX$) i etilen vinil acetat-etilen vinil versatom ($C_{60}EVA-EVV$). Analizom UV-Vis spektra dobijenih nano estica utvrđeno je da, za razliku od $C_{60}CDX$ i $C_{60}EVA-EVV$, kod preparata dobijenih formiranjem kompleksa sa natrijum-dodecil sulfatom dolazi do promena na fullerenskom kavezu, što je ukazalo na

mogu u hemijsku modifikaciju ovog fullerena. Iako je pokazano da svi nC_{60} ulaze u elije, nije utvrđena njihova citotoksičnost. Naprotiv, dalja ispitivanja su pokazala da su ove nano estice citoprotektivne jer štite L929 elije od toksičnog dejstva azot monoksida (NO) generisanog različitim donorima. Daljim ispitivanjem mehanizama ovog dejstva utvrđeno je da C_{60} SDS sprečava depolarizaciju mitohondrijalne membrane i aktivaciju kaspaza, odnosno proapoptotski efekat NO. Mehanohemijski pripremljene estice nisu smanjivale nivo NO poreklom od egzogenog donora u sistemu bez elija. Osim toga, utvrđeno je da C_{60} SDS i C_{60} CDX redukuju NO-om indukovani stres u eliji, naročito koncentraciju superoksid anjona, ali ne i samog NO. Ovi podaci sugerišu da protektivni efekat C_{60} nano estica u citotoksičnosti izazvanoj NO-om zavisi od inaktivacije superoksida i smanjena proizvodnje peroksinitrita, a ne od direktne neutralizacije NO.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati kandidata su detaljno upoređeni sa podacima iz literature. Poređenje rezultata sa rezultatima ranijih studija govori da su postignuti rezultati uglavnom saglasni sa dosadašnjim istraživanjima, sa jasnim isticanjem novih saznanja u vezi sa istraživačkim pitanjima.

U ovoj disertaciji jasno je pokazano da oksidativna i citotoksičnost na sposobnost različitih koloidnih rastvora C_{60} proizvedenih metodom izmene rastvarača zavisi od vrste rastvarača koji je bio korišćen za njihovu pripremu. Prema sposobnosti da generišu RKV i izazivaju mitohondrijalnu disfunkciju i nekrozu, po prvi put su rangirani različiti C_{60} preparati i to na sledeći način: THF/ nC_{60} > EtOH/ nC_{60} > H₂O/ nC_{60} . Takođe su potvrđeni već objavljeni podaci da THF/ nC_{60} uglavnom izaziva nekrozu (Isakovic, Markovic i sar., 2006), tip elijske smrti za koju je karakteristično oštećenje elijske membrane, a ne apoptozu, programiranu elijsku smrt u kojoj elijska membrana ostaje intaktna, uz istovremenu fragmentaciju DNK (Edinger i Thompson, 2004). Ovo bi moglo da bude važno za razvijanje nC_{60} kao antitumorskog agensa jer se smatra da nekroza zbog svojih imunostimulativnih aktivnosti može biti efikasnija od apoptoze u regresiji tumora (Edinger i Thompson, 2004). Upotrebom fluorescimetrijskih analiza je pokazano da tretman elija sa

THF/nC₆₀ dovodi do značajnog pada membranskog potencijala mitohondrija. Poznato je da povećanje propustljivosti mitohondrijalne membrane (MPT) u uslovima mitohondrijalne depolarizacije može da igra centralnu ulogu u nekim oblicima nekroze izazvane oksidativnim stresom (Lemasters, Nieminen i sar., 1998), tako da ovi rezultati sugerišu da je upravo MPT uzrok nekroze izazvane THF nano esticama. Rezultati eksperimentalne analize proizvodnje RKV-a od strane tri različita preparata nC₆₀ su dobro korelisali sa njihovom citotoksičnošću, što je bilo u skladu sa opštom činjenicom da RKV značajno doprinosi citotoksičnosti THF/nC₆₀ (Sayes, Gobin i sar., 2005; Isakovic, Markovic i sar., 2006). Interesantno je da je H₂O/nC₆₀ izazvao nizak nivo nekroze iako nije doveo do nastanka RKV. Ovo je u saglasnosti sa podacima o genotoksičnosti H₂O/nC₆₀ i EtOH/nC₆₀ (Dhawan, Taurozzi i sar., 2006) i ukazuje na mogućnost da je citotoksičnost nC₆₀ delimično nezavisna od produkcije RKV. U ovoj studiji analiziran je i doprinos produkcije RKV i oksidativnog stresa citotoksičnosti nC₆₀. Reaktivnost DHR i H₂DCFDA, fluorescentnih boja koje mere produkciju različitih oblika RKV, ukazala je na to da superoksid anjon, hidroksil radikal i vodonik peroksid mogu da budu generisani u vodenom rastvoru THF/nC₆₀. Ovakva pretpostavka je u saglasnosti sa ranije pokazanim rezultatima da nC₆₀ u vodenom rastvoru produkuje superoksid (Sayes, Gobin i sar., 2005), kao i superoksid i hidroksil radikal (Yamakoshi, Umezawa i sar., 2003). Ova studija takođe pokazuje da rastvor fullerenskih nano estica izložen zračenju, ne samo što gubi sposobnost da indukuje oksidativni stres, lipidnu peroksidaciju i nekrotičnu ćelijsku smrt, već i stiče citoprotektivna svojstva i štiti ćelije od oksidativnog stresa. Promene u fizičko-hemijskim karakteristikama nano estica koje uzrokuju ovaj obrt u biološkim efektima verovatno uključuju razgradnju THF i derivatizaciju površine nano estica. Na osnovu rezultata ove studije, fullerenski kavez THF/nC₆₀ ostaje netaknut posle izlaganja zracima, što je u skladu sa podacima dobijenim sa istim praškastim C₆₀ (Albarrán, Basiuk i sar., 2004). Sa druge strane, dolazi do razgradnje THF unutar nanokristala, što se vidi po pojavljivanju anhidridnih grupa u FTIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*) analizi. Imaju u vidu da tokom gama radiolize vode i THF dolazi do stvaranja velikog broja različitih slobodnih radikala (Baxendale, Beaumont i sar., 1970; Draganic, 1971), moguće je da dolazi i do dodatne derivatizacije površine nC₆₀ tokom zračenja. Na osnovu ovih rezultata bi moglo

da se zaključi i da je THF odgovoran za toksičnost THF/nC₆₀, i da stoga nije pogodan za pripremu fulerenskih nanoestica u biomedicinske svrhe. Interesantno je, međutim, da sam THF nije toksičan jer ne proizvodi RKV (Sayes, Fortner i sar., 2004) i ne utiče na ćelijski vijabilitet ni u sto puta većim koncentracijama od onih koje se nalaze u sastavu nanokristala nC₆₀ (Isakovic, Markovic i sar., 2006; Sayes, Gobin i sar., 2005). Zbog toga je zaključak ove disertacije da verovatno postoji neka vrsta interakcije, odnosno sinergističkog delovanja između nC₆₀ i THF organskog rastvarača koja dovodi do stvaranja RKV i citotoksičnosti THF/nC₆₀. Na primer, opisana sposobnost THF-a da negativno naelektriše površinu nC₆₀ kristala prenosom naelektrisanja (Sayes, Fortner i sar., 2004; Brant, Lecoanet i sar., 2005) mogla bi da utiče na kapacitet nC₆₀ da u interakciji sa vodom formira RKV. Ova studija miri suprotstavljena i donekle uprošćena gledišta da produkcija RKV i citotoksičnost fulerenskih nanoestica u potpunosti zavise od rastvarača (THF) koji se koristi za njihovu pripremu (Andrievsky, Kosevich i sar., 1995) ili da uopšte ne zavise od njega (Sayes, Fortner i sar., 2004).

Drugi deo ove disertacije bavi se analizom strukturnih karakteristika, kao i redoks efekata mehanohemijski pripremljenih kompleksa C₆₀ sa različitim molekulima (SDS, ciklodekstrin i EVA-EVV). Za ovako pripremljene nC₆₀, za razliku od fulerenskih nanoestica pripremljenih metodom izmene rastvarača, već je pokazano da poseduju antioksidativna svojstva (Takada, Kokubo i sar., 2006). Ova studija je utvrdila da mehanohemijski pripremljene nC₆₀ mogu da zaštite ćelije sisara od smrti indukovane NO-om. Dok je za polihidroksilovane fulerene derivatizovane malonskom kiselinom već pokazano da inhibiraju aktivnost NO-sintaze i da pokazuju sposobnost da snize koncentraciju NO (Wolff, Papoiu i sar., 2000; Mirkov, Djordjevic i sar., 2004), rezultati ove disertacije su po prvi put prikazali mehanizme kojim nC₆₀ neutralizuje citotoksičnost izazvanu NO-om. Dobijeni rezultati sugerišu da C₆₀ nanoestice mogu da neutrališu superoksid koji proizvode mitohondrije i da na taj način sprečavaju mitohondrijalno oštećenje i naknadnu inicijaciju apoptoze. Ovakvu hipotezu podržavaju eksperimenti sa fluoroforima specifičnim za različite kiseonikne (DHE, koji meri superoksid) i azotne radikale (DAF, koji meri NO), koji pokazuju da su i C₆₀SDS i C₆₀CDX sposobni da snize

nivo intracelularnog kao i hemijski generisanog superoksid anjona. To je u skladu sa ve poznatom injenicom da su C₆₀ nano estice, rastvorene uz koriš enje polivinilpirolidona ili ciklodekstrina, sposobne da efikasno vežu i O₂⁻ i OH⁻ u sistemu bez elija (Ghafourifar, Schenk i sar., 1999; Xiao, Takada i sar., 2005). S obzirom na to da podaci dobijeni u ovoj studiji direktno protivre e saznanjima o tome da polihidroksilovane fullerenske nano estice vezuju NO nastao od SNP-a u *in vitro* uslovima bez elija (Mirkov, Djordjevic i sar., 2004), druga ije ponašanje nC₆₀ mehanohemijski sintetisanog ovoj studiji, ostaje da bude razjašnjeno.

D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije

1. **Misirkic MS**, Todorovic-Markovic BM, Vucicevic LM, Janjetovic KD, Jokanovic VR, Dramicanin MD, Markovic ZM, Trajkovic VS. The protection of cells from nitric oxide-mediated apoptotic death by mechanochemically synthesized fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Biomaterials* 2009;30(12):2319-28.

2. Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Kleut D, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, **Misirkic M**, Vucicevic L, Janjetovic K, Isakovic A, Harhaji L, Babic-Stojic B, Dramicanin M, Trajkovic V. The mechanism of cell-damaging reactive oxygen generation by colloidal fullerenes. *Biomaterials* 2007;28(36):5437-48.

E) Zaklju ak (obrazloženje nau nog doprinosa)

Doktorska disertacija Maje Misirki Marjanovi pod naslovom „Mehanizmi citotoksi nog i citoprotektivnog dejstva fullerenskih (C₆₀) nano estica“ predstavlja originalan rad iz oblasti eksperimentalne biomedicine. Doprinos ove disertacije na polju prou avanja efekata fullerenskih nano estica je u definisanju uloge rastvara a i samog C₆₀ molekula u citotoksi nosti fullerenskih nanokristala, kao i u razjašnjavanju mehanizama antioksidativnog dejstva mehanohemijski pripremljenih nC₆₀. Rezultati ove studije zna ajno doprinose razvoju metodologije za potencijalnu upotrebu fullerenskih preparata u le enju tumora i antioksidativnoj terapiji. Pri izradi ove disertacije koriš eni su adekvatni,

savremeni eksperimentalni pristupi i metode po svim kriterijumima nau no-istraživa kog rada.

F) Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije

Doktorska disertacija pod nazivom „Mehanizmi citotoksi nog i citoprotektivnog dejstva fullerenskih (C₆₀) nano estica“ kandidata Maje Misirki Marjanovi , po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživa kim ciljevima, dobro osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaklju cima ispunjava sve kriterijume dobro napisanog nau nog rada.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dipl. molekularnog biologa Maje Misirki Marjanovi pod nazivom „Mehanizmi citotoksi nog i citoprotektivnog dejstva fullerenskih (C₆₀) nano estica” i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 22. 4.2015.

Mentor:

Prof. dr Vladimir Trajkovi

lanovi Komisije:

Prof. dr Aleksandra Isakovi

N.Sav. dr Zoran Markovi

Doc. dr Vladislav Volarevi