

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Иване Миленковић, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 14.11.2019. године, одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Иване Миленковић, мастер биохемичара, истраживача сарадника Института за мултидисциплинарна истраживања, под називом:

„Токсичност и биолошки утицај наночестица церијум-оксида обложених угљеним хидратима на одабране модел организме”

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је, на својој седници одржаној дана 30.4.2020. године, на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (број одлуке: 61206-5327/6-20).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и подноси Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Иване Миленковић написана је на 120 страна, А4 формата (фонт 12, проред 1) и садржи 31 слику и 12 табела. Подељена је на поглавља: 1. Увод (1 страна), 2. Преглед литературе (10 страна), 3. Експериментални део (9 страна), 4. Резултати и дискусија (60 страна), 5. Закључак (2 стране), 6. Литература (15 страна). Поред наведеног, дисертација садржи извод на српском и енглеском језику (по једна страна), Садржај (3 стране), Листу скраћеница (2 стране), Захвалницу (1 страна) и Прилоге у којима се налази Биографија кандидата (1 страна), Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

У Уводу је описан предмет истраживања ове докторске дисертације, као и њени циљеви. Кандидаткиња истиче значај и разноврсну примену наночестица церијум-оксида у различитим областима, а посебна пажња је посвећена актуелности њиховог облагања угљеним хидратима у циљу повећања растворљивости у воденој средини. Циљ ове

дисертације је био испитивање оптималних услова за облагање наночестица церијум-оксида, карактеризација обложених наночестица и испитивање њихове токсичности и биолошког утицаја на одабране модел организме. Након дефинисања циља, кандидаткиња је таксативно навела задатке истраживања, који су детаљно разрађивани у наредним поглављима дисертације.

Преглед литературе обухвата две целине. У првој целини описане су наночестице церијум-оксида, укључујући њихову структуру, својства, примену, синтезу и могућности побољшања њихове стабилности облагањем, уз разматрање особина глукозе, левана и пулулана као материјала за облагање. Друга целина указује на последице присуства, судбину и трансформацију наночестица церијум-оксида у животној средини, уз опис њиховог ефекта на четири биљне врсте (пшеницу, грашак, сочиво и кукуруз) и организме *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* и *Danio rerio*.

У оквиру експерименталног дела наведен је детаљан опис експерименталних метода и процедура, реагенаса и узорака који су коришћени у овој дисертацији. Подаци у вези са методама коришћеним за синтезу наночестица и њихову структурну карактеризацију, као и тестовима за испитивање токсичности наночестица јасно и прегледно су написани.

Поглавље Резултати и дискусија подељено је на три целине у којима је кандидаткиња детаљно приказала и продискутовала добијене резултате. Прво су приказани резултати облагања наночестица церијум-оксида угљеним хидратима применом две различите методе, као и резултати карактеризације (применом рендгенске дифракције (XRD), трансмисионе електронске микроскопије високе резолуције (HRTEM), инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (FTIR), рендгенске фотоелектронске спектроскопије (XPS), нуклеарне магнетне резонанце (NMR)) и испитивања стабилности обложених наночестица (применом турбидиметрије, зетаметрије и методе динамичког расејања светлости (DLS)). У другој целини описани су резултати испитивања биолошког ефекта глукозом-, леваном- и пулуланом-обложених наночестица церијум-оксида на одабране биљне врсте, у оквиру којих су приказани статистички обрађени резултати ефекта наночестица на показатеље стреса (укупне антиоксидативне активности (TAA), укупног садржаја фенола (TPC) и промене фенолног профила) и резултати детекције полуиспарљивих једињења добијених применом гасне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом (GC-MS-MS). У оквиру треће целине приказани су резултати испитивања акутне токсичности наночестица церијум-оксида на модел организме *Daphnia magna*, *Danio rerio* и *Vibrio fischeri*, као и утицаја на респирацију *Daphnia magna*.

У поглављу Закључак кандидаткиња је на основу детаљно продискутованих резултата, систематски резимирала закључке који су проистекли из ове дисертације.

У делу Литература (248 цитата) обухваћене су публикације релевантне за област истраживања и покривени су сви делови дисертације.

Б. Кратак приказ резултата

Оптимизацијом услова облагања наночестица церијум-оксида са угљеним хидратима (применом хидротермалне методе облагања током и након синтезе) и карактеризацијом обложених наночестица добијени су следећи резултати:

- Наночестице су успешно обложене методом хидротермалног облагања након синтезе (SC методом), при чему су добијене кристалне структуре обложених наночестица
- Варирање температуре, дужине трајања облагања и масеног односа наночестица и угљеног хидрата коришћеног за облагање није утицало на кристалну структуру обложених наночестица добијених SC методом
- Постигнута је већа стабилност наночестица церијум-оксида облагањем угљеним хидратима, посебно облагањем леваном

Испитивањем токсичности обложених наночестица церијум-оксида на одабраним модел организмима и поређењем са необложеним добијени су следећи резултати:

- Ниједна врста наночестица није имала утицај на клијање семена четири различите биљне врсте
- Концентрација Се је у свим биљкама била већа након свих третмана обложеним наночестицама током клијања, изузимајући ефекат глукозом обложених наночестица
- Транслокација Се из корена у надземни део је била највећа код грашка, а ниједан од третмана током клијања и раста није утицао на степен клијања ниједне тестиране биљне врсте
- Излагање биљака било којој врсти тестираних наночестица церијум-оксида је имало највећи утицај на пшеницу, у погледу растења, ТАА, ТРС и промене фенолног профила, као последица највеће акумулације Се код ове биљке. У корену пшенице, ТРС је био повећан након третмана током клијања, док су растење и ТАА били непромењени, што указује на могућност ТРС-а да појача одбрамбену способност биљке. Може се закључити да одговор биљке на наночестице церијум-оксида зависи од фазе развоја у којој је биљка изложена наночестицама
- Излагање семена наночестицама током процеса клијања је утицало на концентрацију фенолних једињења и дужину надземног дела и корена биљке, док је излагање биљака наночестицама током фазе растења довело до повећања одговора неензимских компоненти антиоксидативног одбрамбеног система и модификације профила фенолних једињења
- Главне промене у профилу испарљивих једињења су детектоване у пшеници након третмана са леваном и пулуланом обложеним наночестицама, као и у

- грашку након третмана са леваном обложеним наночестицама.
- Није било значајних разлика између необложених и обложених наночестица церијум-оксида у односу на контролу када је реч о концентрацији Се и испитивању акутне токсичности различитих наночестица церијум-оксида на водене организме *Danio rerio* и *D. magna*. Код бактерије *V. fischeri*, најмањи степен инхибиције биолуминисценције односно најмању токсичност су показале леваном обложене наночестице
 - Глукозом и леваном обложене наночестице су узроковале највећу производњу CO_2 при концентрацији 200 mg L^{-1} , док разлике у потрошњи O_2 нису биле значајне између третмана различитим наночестицама. Приказани резултати су у сагласности са највећом стабилношћу водених суспензија глукозом и леваном обложених наночестица у односу на остале испитане наночестице церијум-оксида
 - Због одсуства статистичке значајности у односу на контролу, може се закључити да су необложене и угљеним хидратима обложене наночестице церијум-оксида безбедне по тестиране модел организме када се примене у испитаним концентрацијама

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Наночестице церијум-оксида су јединствен наноматеријал због постојања могућности измене Ce^{4+} и Ce^{3+} оксидационих стања у кристалној решетци [1], због чега је њихова примена у порасту у различитим областима, као што су биомедицина, електроника, производња катализатора и биосензора [2]. Због слабе растворљивости у води и повећања биокомпатибилности, веома је актуелно облагање површине наночестица церијум-оксида различитим једињењима [3-6].

У дисертацији је површина наночестица церијум-оксида облагана са глукозом - једноставним угљеним хидратом већ коришћеним у сврху облагања [7] и микробним егзополисахаридима леваном и пулуланом због њихове биокомпатибилности и могућности формирања филма. У ту сврху су коришћене стандардна и модификована хидротермална метода током односно након синтезе наночестица, уз оптимизацију услова облагања. Испитана је токсичност и биолошки утицај три врсте обложених наночестица церијум-оксида на одабраним модел организмима уз поређење са необложеним наночестицама. У литератури се могу пронаћи примери облагања наночестица церијум-оксида глукозом и леваном [7,8], али нема података о испитивању утицаја глукозом, леваном и пулуланом обложених наночестица церијум-оксида на одређене модел организме. У дисертацији је први пут за облагање наночестица церијум-оксида коришћена хидротермална метода након синтезе наночестица.

Последњих година веома расте интересовање за примену наночестица церијум-оксида, а имајући у виду њихову годишњу производњу од 10 000 тона [9] неопходно је испититати њихову токсичност по животну средину. У текућој деценији концентрација Се

у земљишту се креће у опсегу од 2 до 150 mg kg⁻¹ [10], а у отпадним водама око 80 µg L⁻¹ [11]. Према досадашњим сазнањима до сада није испитиван ефекат облагања наночестица церијум-оксида на модел организме за разлику од многобројних студија базираних на испитивању ефекта необложених наночестица. Према доступној литератури, до сада није било покушаја да се пулулан користи за облагање наночестица церијум-оксида.

1. Grulke E., Reed K., Beck M., Huang X., Cormack A., Seal S. Nanoceria: factors affecting its pro-and anti-oxidant properties. *Environmental Science: Nano* **2014**, *1*, 429-444. <https://doi.org/10.1039/c4en00105b>
2. Andreescu D., Bulbul G., Özel R.E., Hayat A., Sardesai N., Andreescu S. Applications and implications of nanoceria reactivity: measurement tools and environmental impact. *Environmental Science: Nano* **2014**, *1*, 445-458. <https://doi.org/10.1039/c4en00075g>
3. Barrios A.C., Medina-Velo I.A., Zuverza-Mena N., Dominguez O.E., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. Nutritional quality assessment of tomato fruits after exposure to uncoated and citric acid coated cerium oxide nanoparticles, bulk cerium oxide, cerium acetate and citric acid. *Plant physiology and biochemistry* **2017**, *110*, 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.017>
4. Alpaslan E., Yazici H., Golshan N.H., Ziemer K.S., Webster T.J. pH-dependent activity of dextran-coated cerium oxide nanoparticles on prohibiting osteosarcoma cell proliferation. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2015**, *1*, 1096-1103. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00194>
5. Lord M.S., Tsoi B., Gunawan C., Teoh W.Y., Amal R., Whitelock J.M. Anti-angiogenic activity of heparin functionalised cerium oxide nanoparticles. *Biomaterials* **2013**, *34*, 8808-8818. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.083>
6. Zhai Y., Zhou K., Xue Y., Qin F., Yang L., Yao X. Synthesis of water-soluble chitosan-coated nanoceria with excellent antioxidant properties. *Rsc Advances* **2013**, *3*, 6833-6838. <https://doi.org/10.1039/C3RA22251A>
7. Karakoti A., Kuchibhatla S.V., Babu K.S., Seal S. Direct synthesis of nanoceria in aqueous polyhydroxyl solutions. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 17232-17240. <https://doi.org/10.1021/jp076164k>
8. Bondarenko O.M., Ivask A., Kahru A., Vija H., Titma T., Visnapuu M., Joost U., Pudova K., Adamberg S., Visnapuu T. Bacterial polysaccharide levan as stabilizing, non-toxic and functional coating material for microelement-nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *136*, 710-720. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.093>
9. Majumdar S., Peralta-Videa J.R., Bandyopadhyay S., Castillo-Michel H., Hernandez-Viezcas J.-A., Sahi S., Gardea-Torresdey J.L. Exposure of cerium oxide nanoparticles to kidney bean shows disturbance in the plant defense mechanisms. *Journal of Hazardous Material* **2014**, *278*, 279-287. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.009>
10. Emsley, J. Nature's building blocks: an AZ guide to the elements. *Oxford University Press*, **2011**. ISBN: 978-0-19-960563-7

11. Collin, B.; Auffan, M.; Johnson, A.C.; Kaur, I.; Keller, A.A.; Lazareva, A.; Lead, J.R.; Ma, X.; Merrifield, R.C.; Svendsen, C. Environmental release, fate and ecotoxicological effects of manufactured ceria nanomaterials. *Environmental Science: Nano* **2014**, *1*, 533-548. <https://doi.org/10.1039/C4EN00149D>

Г. Објављени радови и саопштења који чине део дисертације

1. Радови у часописима међународног значаја:

M21, Рад у врхунском међународном часопису

1. **Milenković I.**, Mitrović A., Algarra M., Lázaro-Martínez J. M., Rodríguez-Castellón E., Maksimović V., Spasić S. Z., Beškoski V. P., Radotić K. Interaction of carbohydrate coated cerium-oxide nanoparticles with wheat and pea: stress induction potential and effect on development, *Plants*, **2019**, *8*, 478. (M21, IF2018=2,632, Plant Sciences 59/228) <https://doi.org/10.3390/plants8110478>

M23, Рад објављен у међународном часопису

1. **Milenković I.**, Radotić K., Matović B., Prekajski M., Živković Lj., Jakovljević D., Gojgić-Cvijović G., Beškoski V. Improving stability of cerium oxide nanoparticles by microbial polysaccharides coating, *Journal of Serbian Chemical Society*, **2018**, *83*, 745- 757. (M23, IF=0,828, Chemistry, Multidisciplinary (140/172)) <https://doi.org/10.2298/JSC171205031M>

2. Саопштења са домаћих и међународних скупова

M34, Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

1. **Milenković I.**, Radotić K., Matović B. Anticancer properties of nanoceria. In: Book of Abstracts / 12th International PhD Student Symposium Horizons in Molecular Biology, 14- 17th September 14-17, **2015**, Gottingen, Germany, p. 101.
2. **Milenković I.**, Radotić K., Matović B. The methods for nanoceria's coating in order to improve its solubility. In: Proceedings of NANT 2015 / 2nd International Conference "Modern methods of testing and evaluation in science", 14-15th December, **2015**, Belgrade, Serbia, p.209.
3. **Milenković I.**, Radotić K., Matović B. The methods of nanoceria's coating for improving their biomedical application. In: Program and the Book of Abstracts / 2nd Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students, 10-13th February **2016**, Belgrade, Serbia.
4. **Milenković I.**, Algarra M., Spasić S., Mitrović A., Beškoski V. P., Radotić K. Total antioxidant activity in wheat and pea seedlings treated with uncoated and polysaccharide

- coated CeO₂ nanoparticles. In: Book of Abstracts/3rd International Conference of Plant Biology, 9-12th June, **2018**, Belgrade, Serbia, p. 65.
5. **Milenković I.**, Algarra M., Spasić S., Maksimović V., Mitrović A., Beškoski V., Radotić K. Phenolic profile of two crop species treated with polysaccharide coated CeO₂ nanoparticles. In: Book of Abstracts/Plant Abiotic Stress Tolerance V, July 5-6th, **2018**, Vienna, Austria, p. 34.
 6. **Milenković I.**, Radotić K., Matović B., Prekajski M., Živković Lj., Jakovljević D., Gojgić-Cvijović G., Beškoski V. Coating of cerium oxide nanoparticles with different carbohydrates. In: Programme and the Book of Abstract/5th Conference of the Serbian Society for Ceramic Materials, June 11-13th, **2019**, Belgrade, Serbia, p. 57.
 7. **Milenković I.**, Bartolić D., Algarra M., Kostić Lj., Nikolić M., Radotić K. The examination of ecotoxic effect of folic acid based carbon dots on maize. In: Proceedings/27th International Conference Ecological Truth and Environmental Research, June 18-21th, **2019**, Belgrade, Serbia, p. 305-310.
 8. **Milenković I.**, Radotić K., Matović B., Prekajski M., Živković Lj., Beškoski V. Coating of cerium oxide nanoparticles with different carbohydrates and their application on plants. In Book of Abstracts/13th Conference for Young Sciences in Ceramics, October 16-19, **2019**, Novi Sad, Serbia, p. 39.

M63, Саопштење са скупа националног значаја штампано у целини

1. **Milenković I.**, Algarra M., Spasić S., Mitrović A., Beškoski V., Radotić K. The influence of coated nanoCeO₂ on the phenol content in wheat and pea. In: Book of Abstracts/Serbian Biochemical Society Seventh Conference, 10th November, **2017**, Belgrade, Serbia, p. 165-167.

M64, Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу

1. **Milenković I.**, Radotić K., Mojović M., Pešić M. Cytotoxic effect of nanoceria on colon cancer cells (HT-29). In: Book of Abstracts / Third Conference of Young Chemists of Serbia 3KMHS-3CYCS, 24th October, **2015**, Belgrade, Serbia, p. 66.
2. **Milenković I.**, Radotić K., Matović B., Beškoski V. P. The effect of nanoceria's coating on their suspension stability. In: Book of Abstracts / Fourth Conference of Young Chemists of Serbia, 5th November, **2016**, Belgrade, Serbia p. 86.
3. **Milenković I.**, Radotić K., Despotović J., Kekez B., Lješević M., Nikolić A., Beškoski V. P. In vivo toxicity of naked and coated CeO₂ nanoparticles. In: Book of Abstracts/Serbian Biochemical Society Sixth Conference, 11th November, **2016**, Belgrade, Serbia, p. 137.
4. **Milenković I.**, Spasić S., Mitrović A., Beškoski V., Radotić K. Effect of polysaccharide coated CeO₂ nanoparticles on total phenolic content of two crop species. In: Programme &

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налазе у извештају из програма „iThenticate” којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Токсичност и биолошки утицај наночестица церијум-оксида обложених угљеним хидратима на одабране модел организме”, аутора Иване Љ. Миленковић, констатујем да утврђено подударане текста износи 4 %. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

Стога сматрамо да је утврђено да је докторска дисертација **Иване Миленковић** у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Ђ. Закључак

Комисија је на основу детаљног прегледа докторске дисертације под насловом „Токсичност и биолошки утицај наночестица церијум-оксида обложених угљеним хидратима на одабране модел организме” закључила да је кандидаткиња Ивана Миленковић успешно одговорила на постављене задатке везане за испитивање оптималних услова за облагање наночестица церијум-оксида различитим угљеним хидратима и испитивање њихове токсичности и биолошких ефеката на одабране модел организме.

Научно-истраживачки рад кандидаткиње је публикован у оквиру два научна рада која су директно проистекла из докторске дисертације: један рад у врхунском међународном часопису (категирија М21) и један рад у међународном часопису (категирија М23). Такође, резултати истраживања проистекли из ове дисертације су саопштени на осам саопштења на скупу од међународног значаја штампаних у изводу (категирија М34), једном саопштењу на скупу националног значаја штампано у целини (категирија М63) и и четири саопштења на скупу националног значаја штампаних у изводу (категирија М64). Комисија је мишљења да резултати објављени у поднетој докторској дисертацији представљају значајан допринос проучавању наноматеријала, микробних егзополисахарида и екотоксикологије.

На основу свега изложеног, а у складу са Законом о Универзитету и Статутом Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени услови за одбрану докторске дисертације и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да поднету докторску дисертацију **Иване Љ. Миленковић**, мастер биохемичара, под насловом „Токсичност и биолошки утицај наночестица

церијум-оксида обложених угљеним хидратима на одабране модел организме”
прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских
наука.

Комисија:

др Владимир Бешкоски, ванредни професор
Хемијски факултет Универзитета у Београду, ментор

др Ксенија Радотић Хаџи-Манић, научни саветник,
Институт за мултидисциплинарна истраживања,
Универзитет у Београду

др Љубодраг Вујисић, доцент,
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Бранко Матовић, научни саветник
Институт за нуклеарне науке ”Винча“

др Јелена Трифковић, ванредни професор, Хемијски
факултет, Универзитет у Београду

У Београду,

11.05.2020. године