

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 17.11.2022. godine, broj 11/X-4/4-MK, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Molekularni mehanizmi protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka u *in vitro* modelu oštećenja neuronskih ćelija oksidativnim stresom“

kandidata **master molekularnog biologa i fiziologa Matije P. Krunića**, zaposlenog na Univerzitetnoj klinici Slobodnog Flamanskog Univerziteta u Briselu, Belgija. Mentor teze je profesor dr Vladimir Trajković, a komentor naučni saradnik dr Biljana Ristić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Sonja Misirlić Denčić, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. dr Verica Paunović, viši naučni saradnik, Medicinski fakultet u Beogradu
3. dr Mihajlo Bošnjak, naučni saradnik, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
4. Prof. dr Miloš Mojović, redovni profesor, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu
5. Prof. dr Silvana Andrić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija doktoranda Matije P. Krunića napisana je na ukupno 103 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 3 sheme, 3 tabele i 41 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu. U poslednjem poglavlju je iznet pregled literature citirane u doktorskoj disertaciji, koji sadrži 222 literaturna izvora. Struktura i kompozicija rada u celini sadrže sve elemente i zadovoljavaju sve kriterijume doktorske disertacije.

U **uvodu** su opisane osnovne strukturne i fizičko-hemijske karakteristike grafenskih kvantnih tačaka (GKT). Prikazane su njihove fotoluminiscentne karakteristike, visoka biokompatibilnost, niska citotoksičnost i fotonestabilnost. Opisano je i otkriće molekula grafena za koje su fizičari Novosel i Gejm dobili Nobelovu nagradu 2010. godine. Prikazane su metode sinteze GKT, pri čemu je istaknuto je da je automatizacija procesa sinteze i hemijske modifikacije GKT omogućila široku primenu ovih nanomaterijala. GKT se mogu koristiti kao detektori različitih jonskih vrsta, senzori za detekciju različitih biomolekula, nosači lekova i agensi u fotodinamičkoj terapiji. U ovom poglavlju opisane su prooksidativne i antioksidativne karakteristike GKT. Opisan je *in vitro* model oksidativnog stresa upotrebljen u eksperimentalnom delu doktorske disertacije, osnovne karakteristike natrijum nitroprusida (SNP), kao i njegova uloga egzogenog donora azot monoksida ($\text{NO}\bullet$) u ćelijskom modelu oksidativnog stresa. Oksidativni stres je definisan kao poremećaj ravnoteže u procesu formiranja i uklanjanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV), a opisan je i mehanizam nastanka ključnih RKV i reaktivnih azotnih vrsta (RAV): superoksidnog radikala ($\text{O}_2\bullet^-$); hidroksilnog radikala ($\text{OH}\bullet$) i peroksinitrita (ONOO^-). Posebano je opisan proces formiranja $\text{OH}\bullet$ u Fentonovoj reakciji, jednoj od specifičnih vrsta Haber-Vajs reakcije. Imajući u vidu da oksidativni stres dovodi do apoptoze, u uvodu je dat osvrt na ovaj tip ćelijske smrti i opisani su signalni putevi i molekuli neophodni za odvijanje ovog procesa. S obzirom na sposobnost GKT i SNP da indukuju autofagiju, u uvodu su takođe prikazane i karakteristike autofagije sa posebnim osvrtom na njen značaj u fiziološkim i patološkim uslovima. Posebna pažnja usmerena je na opis najznačajnijih signalnih puteva i molekula neophodnih za odvijanje i regulaciju pojedinačnih faza autofagije. Takođe je opisan

uticaj GKT na proces autofagije u različitim tipovima ćelija u kulturi, kao i uticaj GKT na autofagiju u *in vivo* uslovima.

Imajući u vidu da uticaj GKT u modelu oksidativnog stresa izazvanog SNP-om do sada nije ispitivan, u okviru ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći **ciljevi**: (1) Ispitati citoprotektivno dejstvo GKT u oksidativnom stresu izazvanom SNP-om u SH-SY5Y neuronskim ćelijama *in vitro*, (2) Ispitati mehanizme i ulogu modulacije reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta u neuroprotektivnom dejstvu GKT u modelu oksidativnog stresa izazvanog SNP-om *in vitro* i (3) Ispitati mehanizme i ulogu autofagije u neuroprotektivnom dejstvu GKT u oksidativnom stresu izazvanom SNP-om *in vitro*.

U poglavlju **Materijal i metode** detaljno su opisani protokoli svih eksperimentalnih procedura korišćenih u izradi doktorske disertacije. Najpre je opisan metod sinteze GKT elektrohemijском oksidacijom grafita, kao i njihova fizičko-hemijska karakterizacija metodama spektroskopije, mikroskopijom atomskih sila i transmissionom elektronskom mikroskopijom visoke rezolucije (HR-TEM). Navedene su ćelijske linije, njihove karakteristike i uslovi održavanja, kao i svi reagensi i rastvori korišćeni u eksperimentalnom radu. U realizaciji ciljeva ove doktorske disertacije korišćeni su odgovarajući testovi za ispitivanje vijabiliteta ćelija, metode fazno-kontrastne mikroskopije za utvrđivanje morfoloških promena ćelija, spektrofotometrijski testovi i metode elektronske paramagnetne rezonance za određivanje prisustva različitih radikalskih vrsta. Protočna citofluorimetrija korišćena je za analizu parametara ćelijske smrti, produkcije RKV i RAV, aktivacije kaspaza, depolarizacije mitohondrija i statusa autofagije. Imunoblot analiza korišćena je za određivanje ekspresije i aktivnosti proteina od interesa, transmissiona elektronska mikroskopija (TEM) za ultrastrukturnu analizu ćelija i metoda kvantitavne reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-qPCR) za utvrđivanje nivoa ekspresije iRNK odgovarajućih molekula. Procena antagonističkog efekta kombinacije SNP i GKT na vijabilnost ćelija određivana je izračunavanjem α indeksa. Statistička značajnost analizirana je Studentovim t-testom za dva nezavisna uzorka ili jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) za veći broj nezavisnih uzoraka. Značajnom je smatrana p-vrednost manja od 0,05.

Istraživanja iz kojih je proistekla ova doktorska disertacija odobrena su od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

U poglavlju **Diskusija** doktorand je na sveobuhvatan način interpretirao dobijene rezultate i na detaljan način ih povezoao sa rezultatima sličnih istraživanja drugih autora objavljenih u međunarodnim naučnim časopisima. Na osnovu toga, izneo je svoje zaključke koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije i opisao njihov potencijalni terapijski značaj.

Poglavljje **Zaključci** sumira ključene zaključke proizašle iz rezultata disertacije koji u potpunosti odgovaraju postavljenim ciljevima.

U poglajavu **Literatura** su navedena 222 literarna izvora uređena prema abecedi.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Unverzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa *iThenticate* kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije, utvrđeno podudaranje teksta iznosi **17%**. Najveći deo podudarnosti pronađen je u poglavlju 3 („Materijali i metode”), gde je program *iThenticate* kao tačke podudarnosti prepoznao nazive većine upotrebljenih hemikalija i reagenasa, i njihove proizvođače, kao i uputstva za izvođenje eksperimentalnih metoda. Ostatak podudarnosti se odnosio na korišćenje opšteprihvaćenih i široko korišćenih reči i fraza u opisivanju pojava koje se pominju u disertaciji, kao i pominjanje određenih ličnih imena, imena institucija i sl.. Pored toga, u svim ostalim poglavljima disertacije, osim nužnih podudaranja pomenutih opštih mesta, nisu nađene podudarnosti sa navedenim tvrdnjama ili misaonim celinama. Verujemo da ne bi bilo moguće dalje značajno smanjiti procenat podudarnosti, bez izostavljanja ključnih podataka o materijalima i smanjivanja tačnosti i preciznosti objašnjenja metoda koje su korišćene u izradi ove disertacije, a koje bi išlo nauštrb reproducibilnosti rezultata. S druge strane, u poglavljima 1 („Uvod”), 2 („Ciljevi”), 4 („Rezultati”), 5 („Diskusija”) i 6 („Zaključci”), nađena je podudarnost prevashodno u citatima, te pojedinačnim rečima i često korišćenim frazama koje se tiču pojava koje se obrađuju u disertaciji. Napominjemo da nijedna misaona celina, niti pojedinačna tvrdnja, izneta u poglavljima 4 („Rezultati”), 5 („Diskusija”) i 6 („Zaključci”), gde se apsolutno zahteva originalnost i autentičnost u doprinosu naučno-istraživačkom radu, nije pokazala podudarnost sa do sada objavljenim radovima, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika.

C) Kratak opis postignutih rezultata

U poglavlju **Rezultati** jasno su prikazane fizičko-hemijske karakteristike GKT. Metodom UV-Vis spektroskopije pokazano je da GKT imaju apsorpcioni maksimum u UV oblasti na 210 nm talasne dužine. Takođe, detektovana je i apsorpciona promena na 345 nm talasne dužine koja je karakteristična za prisustvo C=O veze. Fluorescentnom spektroskopijom pokazano je da GKT poseduju maksimalan intenzitet emisije nakon ekscitacije svetlošću talasne dužine 360 nm. Rezultati dobijeni metodama mikroskopije atomskih sila i HR-TEM su ukazali na nanometarske dimenzije GKT sa dijametrom od 10-15 nm. Antioksidativne karakteristike GKT potvrđene su korišćenjem različitih spektrofotometrijskih radikalskih testova. Dodatna potvrda antioksidativnih svojstava GKT dobijena je i metodom elektronske paramagnetne rezonance, koja se smatra "zlatnim standardom" za detekciju slobodnih radikala. S obzirom da su prethodne studije ukazale da SNP izaziva smrt ćelija u kulturi, različitim testovima vijabiliteta ispitivana je citotoksičnost SNP na SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma i U251 ćelija glioma, kao i uticaj tretmana GKT na citotoksičnost SNP. Utvrđeno je da SNP dovodi do smrti ćelija, dok tretman GKT smanjuje uočene citotoksične efekte SNP. Ćelijska smrt izazvana SNP-om imala je morfološke i biohemijske karakteristike apoptoze, što je pokazano detekcijom eksternalizovanog fosfatidil-serina, aktivacijom kaspaza i DNK fragmentacijom. Apoptoza indukovana SNP-om zavisila je od aktivacije kaspaze-2 koja dovodi do indukcije unutrašnjeg (mitohondrijalnog) puta aktivacije apoptoze. Smanjenje citotoksičnih efekata SNP u prisustvu GKT ukazalo je na ključnu ulogu RKV i RAV u oksidativnom stresu izazvanom SNP-om. Protektivno dejstvo GKT zavisilo je od neutralizacije citotoksičnog OH• nastalog u Fentonovoj reakciji katalizovanoj gvožđem poreklom iz SNP, dok je neutralizacija NO• i O₂^{•-} imala manju ulogu u uočenoj citoprotekciji. TEM analiza unutarćelijske lokalizacija GKT pokazala je prisustvo GKT u autofagozomima i autolizozomima, što potvrđuje da je za antioksidativne sposobnosti GKT u neutralizaciji RKV i RAV neophodna njihova internalizacija. Imunoblot analizom je detektovana konverzija LC3-I u marker autofagozoma LC3-II, kao i smanjenje nivoa membranskog receptora SQSTM1/p62 u ćelijama tretiranim SNP-om i GKT. Prisustvo autofagije indirektno je potvrđeno i primenom protočne citofluorimetrije, gde je pokazano značajno povećanje u acidifikaciji lumena citoplazmatskih vezikula korišćenjem pH-senzitivne boje akridin oranž. U cilju ispitivanja mehanizama koji se nalaze u osnovi indukcije autofagije, analizirana je fosforilacija ključnih signalnih proteina koji kontrolišu ovaj proces. Aktivacioni status mTOR-a kao negativnog regulatora autofagije, i njegovog aktivatora Akt kinaze, ispitivan je imunoblot metodom. Takođe, RT-qPCR metodom ispitana je ekspresija gena koji regulišu autofagiju. Rezultati su pokazali da kombinovani tretman SNP-om i GKT indukuje proces

autofagije dvojako: inhibicijom AKT/mTOR signalnog puta, kao i aktivacijom transkripcije ključnih proautofagnih gena. Analizirana je i degradativna sposobnost autofagije merenjem autofagnog fluksa imunoblot analizom LC3-II nakon primene proteolitičkog inhibitora bafilomicina A1, kao i ispitivanjem nivoa SQSTM1/p62 kao selektivnog autofagnog supstrata. Bafilomicin A1, inhibitor protonske pumpe, smanjuje acidifikaciju lizozoma i blokira autofagnu proteolizu, čime se inhibira razgradnja LC3-II u autolizozomima. Rezultati su pokazali povećanje ekspresije proautofagnog beklina-1, degradaciju SQSTM1/p62, kao i pojačanu konverziju LC3-I u LC3-II u prisustvu inhibitora lizosomalne acidifikacije, što govori u prilog povećanja autofagnog fluksa, odnosno aktivacije kompletnog procesa autofagije. Kako bi se utvrdila veza između antioksidativnih karakteristika GKT i njihove uloge u indukciji autofagije, SH-SY5Y ćelije su tretirane antioksidantom N-acetil cisteinom (NAC) u prisustvu SNP i BAF. Rezultati imunoblot analize su pokazali da NAC nije modulirao autofagni fluks u prisustvu SNP, što ukazuje da pro-autofagna sposobnost GKT u prikazanom eksperimentalnom sistemu nije zavisila od njihovog antioksidativnog dejstva. Konačno, rezultati su pokazali da su inhibitori autofagije potencirali ćelijsku smrt u kombinovanom tretmanu SNP-om i GKT. Zajedno, ovi rezultati pokazuju da GKT, nezavisno od njihove antioksidativne aktivnosti, inhibicijom AKT/mTORC signalnog puta indukuju citoprotektivnu autofagiju na transkripcionom i post-translacionom nivou.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Poređenje dobijenih rezultata sa rezultatima ranijih studija ukazuje da su postignuti rezultati u saglasnosti sa dosadašnjim istraživanjima. Takođe, nova saznanja, koja su u vezi sa inicijalno postavljenim istraživačkim ciljevima, jasno su istaknuta u doktorskoj disertaciji.

GKT korišćene u eksperimentalnom radu, poseduju sve prethodno opisane karakteristike GKT: stabilnu fluorescencu (Liu i sar., 2018), rastvorljivost u vodi (Ruan i sar., 2018), nisku citotoksičnost (Nurunnabi i sar., 2013) i odličnu biokompatibilnost (Zhu i sar., 2016). Analiza UV-Vis apsorpcionih spektara ukazala je da GKT poseduju apsorpcioni maksimum u UV delu spektra, dok je dalje povećanje ekscitacione talasne dužine dovelo da pada apsorpcione sposobnosti GKT. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodno opisanim optičkim karakteristikama GKT (Ristic i sar., 2014; Jiang i sar., 2013). Imajući u vidu rezultate Sk i sar., prisustvo defekata na površini i “armchair” oblika ivice GKT su prouzrokovali pomeraj fotoluminiscentne emisije ka plavom delu spektra (Sk i sar., 2014).

Rezultati ovog istraživanja su potvrdili da tretman SNP-om ima citotoksično dejstvo na SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma i U251 ćelija glioma, što je u skladu sa rezultatima

prethodnih istraživanja na različitim ćelijskim linijama (Quan i sar., 2017, Babich i sar., 1998, Nakamura i sar., 1997). Imajući u vidu da su SH-SY5Y ćelije relevantniji *in vitro* model za ispitivanje neurotoksičnosti/neuroprotekcije (Wei i sar., 2017; Cardaci i sar., 2008), ova ćelijska linija je korišćena u daljim eksperimentima.

Blanco i sar. su predložili da je oslobođeni NO glavni medijator u smrti hondrocita indukovanoj SNP-om (Blanco i sar., 1995). U eksperimentima proisteklim iz ove doktorske disertacije pokazano je da tretman PTIO, supstancom koja specifično vezuje i neutrališe ONOO⁻ (nastao u reakciji NO i O₂) nije imao protektivno dejstvo na vijabilitet SH-SY5Y ćelija nakon tretmana SNP-om, kao i da NO nije ključni posrednik citotoksičnosti indukovane SNP-om. Takođe, de Andreas i sar. su pokazali da oslobađanje visokih nivoa NO dobijenih korišćenjem potentnijih donora kao što su SIN-1 i SNAP, nije dodatno smanjilo vijabilitet ćelija u kulturi (de Andres i sar., 2013). Slično, u ovoj disertaciji pokazano je da oslobađanje visokih nivoa NO u rastvoru potentnijeg NO donora (DEA-NONOat) nije dodatno smanjivalo vijabilitet ćelija u kulturi u odnosu na SNP. Dakle, citotoksičnost SNP na SH-SY5Y ćelijama samo je delimično posredovana NO i njegovim produktom ONOO⁻. Prethodni zaključak je u skladu sa ranijim rezultatima u kojima su RKV, koje se u tretmanu SNP-om stvaraju kao nusprodukt nezavisno od NO, odgovorni za citotoksičnost SNP (Quan i sar., 2016; Liang i sar., 2014; Cardaci i sar., 2008; Rauhala i sar., 1998).

Cardaci i sar. su pokazali da je citotoksičnost indukovana SNP-om posledica povećane produkcije RKV u prisustvu jona gvožđa (Fe²⁺) (Cardaci i sar., 2008). Rezultati ove doktorske disertacije potvrdili su da je prisustvo jona Fe²⁺ ključno za smrt SH-SY5Y ćelija indukovanu SNP-om, koja je bila značajno smanjena u prisustvu helatora gvožđa. Takođe je uočeno i povećanje nivoa OH•, a prisustvo GKT ili supstanci sa sposobnošću vezivanja OH• (DMSO, metanol i etanol) imalo je pozitivan uticaj na vijabilitet SH-SY5Y ćelija. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima prethodnih studija u kojima je pokazano da oslobođeni Fe²⁺ iz SNP ima sposobnost katalizovanja Fentonove reakcije u *in vitro* uslovima, kao i u sistemu bez ćelija (Rauhala i sar., 1998; Ramakrishna i sar., 1996). Detaljno ispitivanje antioksidativnog i antinitrozativnog profila GKT ukazalo je na sposobnost GKT da neutrališe OH•, O₂⁻ i NO radikale, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija (Hua i sar., 2019; Chong i sar., 2016).

Prethodno je pokazano da SNP izaziva apoptozu neurona (Cardaci i sar., 2008, Zhang i Zhao, 2003). U skladu sa tim, iz rezultata ove disertacije može se zaključiti da tretman SNP-om indukuje apoptozu zavisnu od kaspaze-2 koja aktivira mitohondrijalni (unutrašnji) put apoptoze, kao i da GKT smanjuju apoptotsku smrt indukovanu SNP-om. Takođe, merenjem nivoa lipidne peroksidacije indirektno je pokazano da GKT smanjuju citotoksičnost indukovanu SNP-om.

Prisustvo GKT smanjilo je nivo lipidne peroksidacije najverovatnije neutralizacijom RKV i posledičnim smanjenjem oksidativnog stresa (Valko i sar., 2005).

Rezultati brojnih istraživanja o uticaju GKT na proces autofagije ukazali su da GKT mogu indukovati autofagiju (Xie i sar., 2019; Tomic i sar., 2017; Markovic i sar., 2012). Takođe, pokazano je da i SNP poseduje pro-autofagnu aktivnost (Chen i sar., 2020; Rim i sar., 2019; Park i sar., 2017). Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da GKT i SNP poseduju sinergističku pro-autofagnu aktivnost na modelu SH-SY5Y ćelija, kako na transkripcionom tako i na translacionom nivou. Pokazano je da se u osnovi indukcije autofagije u prisustvu SNP i GKT nalazi inhibicija Akt/PRAS40/mTOR signalnog puta, kao i povećana ekspresija ključnih pro-autofagnih gena. Poznato je da Akt-zavisna fosforilacija PRAS40 aktivira Raptor-mTOR funkcionalni kompleks (mTORC1). mTORC1 kompleks ima inhibitorski uticaj na proces autofagije (Sancak i sar., 2007). Uočeno je smanjenje u nivoima fosforilisane forme PRAS40, što je posledica smanjene aktivnosti Akt kinaze. Tretman SH-SY5Y ćelija GKT i kombinacijom GKT i SNP pokazao je da je autofagija aktivirana na transkripcionom nivou, kao i da su nivoi BCL2 iRNK sniženi u prisustvu GKT. BCL2 ispoljava svoju inhibitorsku ulogu blokirajući formiranje kompleksa za inicijaciju autofagije (Füllgrabe i sar., 2014). Povećanje nivoa ekspresije gena koji učestvuju u nukleaciji i elongaciji autogofozoma, kao i smanjenje ekspresije ključnih negativnih regulatora autofagije, potvrdili su GKT indukuju autofagiju.

Rezultati prikazani u ovoj tezi po prvi put su ukazali na ulogu autofagije indukovane tretmanom GKT u zaštiti ćelija od oksidativnog i nitrozativnog stresa. Međutim, pokazano je da je indukcija autofagije nezavisna od antioksidativnih sposobnosti GKT. Određene vrste kvantnih tačaka modulacijom oksidativnog stresa utiču na autofagiju, kao što je slučaj sa Fe/AuO kvantnim tačkama koje povećavaju autofagni fluks RKV-indukovanom inhibicijom mTOR (Khan i sar., 2012). Povećanje autofagnog fluksa uočeno je i u prisustvu fullerena na mišijem modelu Alchajmerove bolesti (Tak i sar., 2020). Sarkar i sar. su pokazali da tretman HeLa ćelija različitim donorima NO inhibira autofagiju S-nitrozilacijom c-Jun N-terminalne kinaze 1 i I κ B kinaze, koje učestvuju u regulaciji interakcije između beklina-1 i BCL2 (Sarkar i sar., 2011). U eksperimentima proisteklim iz doktorske disertacije pokazano je da NO poreklom od SNP nije suprimirao autofagiju, što ukazuje na mogućnost da je pro-autofagno dejstvo RKV prevagnulo nad inhibitorskim dejstvom NO. Sposobnost GKT da neutrališu NO mogla je dodatno da spreči inhibitorsko dejstvo NO na autofagiju i tako doprinese sinergističkom pro-autofagnom dejstvu kombinovanog tretmana SNP i GKT.

Iako su pri koncentraciji SNP od 2 mM najizraženiji citoprotektivni efekti uočeni sa relativno visokim koncentracijama GKT, pokazano je da u tretmanu manje toksičnim dozama SNP-a, GKT ispoljavaju citoprotektivne efekte i u koncentraciji od 50 μ g mL⁻¹.

Neurodegenerativna oboljenja karakterišu se oštećenjima krvno-moždane barijere koja bi potencijalno omogućila lokalnu akumulaciju GKT u CNS (Tosic i sar., 2019). Dodatna hemijska modifikacija GKT mogla bi da poveća njihovu sposobnosti da neutrališu RKV i RAV, kao i da indukuju autofagiju, čime bi se takođe omogućilo terapijsko dejstvo nižih koncentracija GKT.

E) Objavljeni rad koji čini deo doktorske disertacije

Matija Krunic, Biljana Ristić, Mihajlo Bošnjak, Verica Paunović, Gordana Tovilović- Kovacević, Nevena Zogović, Aleksandar Mirčić, Zoran Marković, Biljana Todorović- Marković, Svetlana Jovanović, Duška Kleut, Miloš Mojović, Đura Nakarada, Olivera Marković, Irena Vuković, Ljubica Harhaji-Trajković, Vladimir Trajković, **Graphene quantum dot antioxidant and proautophagic actions protect SH-SY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress-mediated apoptotic death**, *Free Radical Biology and Medicine*. 2021; 177: 167-180 (M21a, IF 7.376).

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija kandidata Matije P. Krunića pod nazivom „Molekularni mehanizmi protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka u *in vitro* modelu oštećenja neuronskih ćelija oksidativnim stresom” ima originalni naučni doprinos, s obzirom da do sada nije ispitivana sposobnost GKT da neutrališu različite RKV i RAV u *in vitro* modelu oksidativnog stresa na SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma. Multidisciplinarnim pristupom prvi put je pokazano da GKT imaju sposobnost neutralizacije hidroksilnog radikala (OH•) i radikala azot (II) oksida (NO•). Takođe je prvi put pokazano da je sposobnost GKT da indukuju citoprotektivnu autofagiju potpuno nezavisna od njihovih antioksidativnih svojstava. Imajući u vidu njihovu izrazitu biokompatibilnost, nisku citotoksičnost, visoku antioksidativnu aktivnost, sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i sposobnost indukcije citoprotektivne autofagije, jasno je da GKT predstavljaju dobre kandidate za terapiju neurodegenerativnih i neuroinflamatornih oboljenja u čijoj se patogenezi nalaze oksidativni i nitrozativni stres. Posebna vrednost GKT u ovom kontekstu predstavlja njihova sposobnost da, za razliku od klasičnih antioksidativnih agenasa, istovremeno inhibiraju oksidativni stres i indukuju citoprotektivnu autofagiju, što je i najvažniji rezultat ove doktorske disertacije

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a korišćena metodologija savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju master molekularnog biologa Matije P. Krunića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 22.12.2022.

Mentor:

Prof. dr Vladimir Trajković

Komentor:

N. sar. dr Biljana Ristić

Članovi komisije:

Prof.dr Sonja Misirlić Denčić

VNS dr Verica Paunović

N. sar. dr Mihajlo Bošnjak

Prof. dr Miloš Mojović

Prof. dr Silvana Andrić