

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФИЗИЧКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На седници Изборног и Наставно-научног већа Физичког факултета Универзитета у Београду, одржаној 27.06.2018. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед и оцену докторске дисертације кандидаткиње Јелене Пајовић, дипломиране физичарке, под насловом:

**Biomolecule functionalized gold nanoparticles: photoexcitation processes and application in fluorescence microscopy**

Златне наночестице функционализоване биомолекулима: испитивање фотоексцитационих процеса и примена у флуоресцентној микроскопији

Након увида у достављени материјал, подносимо Наставно-научном већу следећи

**РЕФЕРАТ**

**1. Основни подаци о кандидаткињи**

**1. Биографски подаци**

Кандидаткиња Јелена Пајовић, рођена 31.05.1988. године у Београду, основно и средње образовање је завршила у Београду. Основне академске студије Физичког факултет, смер Теоријска и експериментална физика, уписала је школске године 2007/2008. године, које је завршила са просечном оценом 9.85. Мастер академске студије је завршила на истом смеру Физичког факултета 2012. године са просеком 9.67. Након мастер студија наставила докторске студије на Факултету на смеру Физика кондензованог стања и статистичка физика.

Током докторских студија, кандидаткиња је била сарадница у настави на предметима Лабораторија физике 1 и 2, под руководством проф. др Ђорђе Спасојевића, као и Физика кондензоване материје под руководством доц. др Михајла Ваневића. Такође, две године је водила семинар физике у Истраживачкој станици Петница, а као

сарадница учествовала је на Фестивалу науке од 2007. године. Током основних студија, била је на студентској пракси на Техничком универзитету Илменау, Немачка.

Кандидаткиња је запослена на Физичком факултету и финансирана у оквиру научног пројекта Министарства за просвету, науку и технолошки развој под бројем 171029, под називом Проучавање утицаја третирања на диелектричне, оптичке и магнетне особине површина кристалних и полимерних система. Током докторских студија, била је истраживач на шест научних пројеката рађених у синхротрону Soleil, Француска. Од маја 2016. године до марта 2018. године је била на студијском боравку у синхротрону Soleil.

Основни предмет истраживања кандидаткиње су фотоекцитациони процеси у хибридном системима који укључују наночестице злата функционализоване флуоресцентним биомолекулима као и њихова примена у флуоресцентној микроскопији. Ова истраживања Јелена Пајовић спроводи у Институту за нуклеарне науке „Винча“ у групи др Владимира Ђоковића.

## **2. Научна активност**

Научно-истраживачки рад Јелене Пајовић реализује се у области физике чврстог стања, односно у области нанонаука са посебним освртом на примени хибридних наноструктура у испитивању биолошких система. Своја истраживања везана за докторску дисертацију, кандидаткиња обављала је у Институту за нуклеарне науке „Винча“, Универзитета у Београду у оквиру истраживачке групе др Владимира Ђоковића, као и кроз више истраживачких пројеката у синхротронској инсталацији SOLEIL, којима је руководио др Душан Божанић.

Тема истраживања у оквиру докторске дисертације Јелене Пајовић је развој и испитивање хибридних наноструктура добијених функционализацијом наночестица племенитих метала флуоресцентним биомолекулима, у циљу одређивања положаја наночестица у односу на појединачне ћелије неинванзивном спектроскопском методом – флуоресцентном микроскопијом. Из тог разлога, кандидаткиња се бавила и развојем нових математичких метода за обраду флуоресцентних слика у циљу боље локализације наноструктура у ћелијама.

Од 2016. до 2018. године, кандидаткиња је била на научном боравку у синхротронској инсталацији SOLEIL, Француска, укључена у научно-истраживачки рад на тему транслокације флуоресцентних антибиотика у бактеријским линијама. Циљ пројекта је био изучавање механизма пасивне и активне дифузије малих молекула кроз ћелијску мембрану Грам негативних бактерија, као и њихове поновне екстернализације у околину.

Јелене Пајовић је објавила десет научних радова, од чега два која су у директној вези са њеном докторском дисертацијом, а још две публикације су у припреми. Важно је напоменути да су све објављене публикације кандидаткиње у часописима импакт фактора већег од један, као и да су међу публикацијама Јелене Пајовић и радови у врхунским међународним часописима *Nature Protocols*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *Analyst* и *Scientific Reports*.

## **2. О теми докторске дисертације**

### **1. Основни подаци**

Докторска дисертација „Biomolecule functionalized gold nanoparticles: photoexcitation processes and application in fluorescence microscopy“ кандидаткиње Јелене Пајовић написана је на енглеском језику и има 139 страна, а садржи 47 слика, 7 табела и 191 библиографских јединица. Поред увода и закључка, текст је организован у додатна 4 поглавља.

Први део садржи теоријски увод у коме је дат преглед досадашњих сазнања и достигнућа на тему физичких особина хибридних наноструктура базираних на наночестицама племенитих метала функционализованих биомолекулима. У овом делу описан је утицај интеракције наночестица и датих биомолекула на електронску структуру и оптичка својства хибридних наносистема, као и правци примене оваквих наноструктура у биомедицини. Поглавље 3 посвећено је опису процедура припреме узорака хибридних наноструктура на бази наночестица злата функционализованих биомолекулима триптофаном и рибофлавином, као и прегледу експерименталних техника и метода коришћених за њихово испитивање. Посебна пажња посвећена је опису неконвенционалних експеримената на експерименталним линијама DISCO и

DESIRS синхротронске инсталације SOLEIL на којима су вршена испитивања хибридних наноструктура. Резултати структуре и оптичке карактеризације хибридних наноструктура злато-триптофан, злато-рибофлавин и злато-триптофан/рибофлавин изложени су у Поглављу 4, док су резултати флуоресцентне микроскопије у ултраљубичастој области ексцитација на микробијалним ћелијама *Escherichia coli* и *Candida albicans*, као и ћелијама рака јетре, инкубираним са хибридним наноструктурама приказани у Поглављу 5. Детаљан опис изложених резултата дат је Одељку 2.3 овог Реферата.

Ментор докторске дисертације Јелене Пајовић је др Душан Божанић, научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча“, Универзитета у Београду.

## **2. Предмет и циљ рада**

Истраживања у оквиру докторске тезе Јелене Пајовић обухватају испитивање хибридних наноструктура добијених коњугацијом сферних наночестица злата флуоресцентним биомолекулима ради развоја биомаркера за потребе флуоресцентне микроскопије појединачних ћелија у ултраљубичастој области електромагнетног зрачења.

Наночестице злата представљају један од најиспитиванијих наноструктурних система због својства резонантне апсорпције светлости у видљивом делу спектра површинским плазмоном. Ова карактеристика златних наночестица омогућава брз трансфер апсорбоване енергије на молекуле у окружењу што је довело до широке примене ових наноструктура у биомедицини, било као носиоца лекова или медијатора у фотодинамичким и фототермалним терапијама малигног ткива. Са друге стране, ефикасност наведених нанотехнолошких третмана умногоме зависи од положаја наночестица у односу на испитиване ћелије или ткива. Одређивање локација акумулације наночестица у ћелијама и ткивима конвенционалним методама подразумева хистолошку припрему биолошких узорака, што је временски захтеван и инвазиван процес. Основни циљ истраживања у склопу ове докторске дисертације био је развој метода за одређивање преферентних положаја акумулације наночестица злата у односу на индивидуалне ћелије *Escherichia coli*, *Candida albicans* и рака јетре путем високорезолуционе флуоресцентне микроскопије у ултраљубичастој области.

С обзиром да нису флуоресцентне, да би биле детектоване овом неинванзивном техником наночестице злата су функционализоване биомолекулима триптофана и рибофлавина који испољавају флуоресценцију у ултраљубичастом делу спектра. Поред оптичких особина, ови биомолекули су изабрани и због тога што се емисиони спектар триптофана преклапа са ексцитационим спектром рибофлавина, те ова два молекула представљају погодан пар за манифестовање нерадијативног преноса енергије са триптофана (донор) на рибофлавин (акцептор). Наведена флуоресцентна својства биомолекула пренета су и на хибридне наноструктуре што је омогућило анализу ефикасности нерадијативног преноса енергије између ова два биомолекула, у односу на систем у којем нема нано-злата, као и развој нове методе за одређивање дистрибуције наночестица у ћелијама.

### **3. Преглед научних резултата изложених у дисертацији**

Докторска дисертација описује принцип детекције положаја хибридних наноструктура на бази наночестица злата функционализованих триптофаном и рибофлавином у односу на појединачне ћелије рака јетре услед специфичности фотоексцитационих процеса који се одвијају у наведеним наноструктурама. Локализација наночестица постигнута је комбиновањем експерименталних резултата добијених флуоресцентном микроскопијом у ултраљубичастој области и теоријске анализе динамике промене флуоресцентног сигнала која је установљена анализом фотоексцитационих процеса у хибридних наноструктурама. Такође, текст дисертације описује детаљну карактеризацију хибридних наночестица, структуру њихове валентне зоне, као и резултате флуоресцентне микроскопије у ултраљубичастој области добијене инкубацијом ћелија *Escherichia coli* и *Candida albicans* са наночестицама злата функционализованим триптофаном, односно рибофлавином.

У студији су коришћене сферне наночестице злата димензија  $8\pm 1$  нанометара које је кандидаткиња синтетисала хемијским путем редукцијом тетраклороауринске киселине натријум борохидридом у воденој средини. Добијене наночестице су биле јако стабилне иако нису површински стабилизоване одговарајућим молекулима услед наизменичне адсорпције и десорпције боратних јона. Из тог разлога, површина наночестица је била доступна за функционализацију триптофаном и рибофлавином, као

и са оба ова молекула истовремено. Расподела величина функционализованих наночестица испитана је високо-резулционом трансмисионом електронском микроскопијом, која је показала да процес функционализације не мења значајно морфологију и величину честица.

Природа интеракције између наночестица злата и биомолекула испитивана је Раман спектроскопијом. Показано је да триптофан интерагује са златом преко својих индолних бочних група, док рибофлавин формира везе са наночестицама преко бензена. Овом методом такође је показано да адсорпција на честице не доводи до деградације биомолекула.

Валентна структура изолованих наночестица злата, као и AuTrp, AuRb и AuTrpRb функционализованих наноструктура испитана је фотоемисионом спектроскопијом на линији DESIRS синхротронске инсталације SOLEIL чиме је одређен међусобни утицај валентних трака биомолекула и злата у односу на вакуум. Важно је напоменути да су ово први експерименти ове врсте на изолованим наночестицама контролисане површинске модификације.

Оптичке особине хибридних наноструктура испитиване су апсорпционом и флуоресцентном спектроскопијом у ултраљубичастој и видљивој области. Показано је да биомолекули преносе своја флуоресцентна својства на хибридне наноструктуре, као и да се функционализацијом одржава резонантна апсорпција светлости од стране наночестица злата. Такође, у случају AuTrpRb наноструктура установљен је резонантни трансфер енергије са триптофана на рибофлавин који је показао већу ефикасност у присуству наночестица него у случају смеше биомолекула.

Хибридне наноструктуре коришћене су као флуоресцентни маркери у флуоресцентној микроскопији различитих ћелијских линија у циљу одређивања положаја честица у односу на индивидуалне ћелије. Наночестице злата функционализоване триптофаном коришћене су за микроскопско испитивање бактерија *Escherichia coli*. Показано је да инкубација ћелија са наноструктурама доводи до појачања флуоресцентног сигнала од приближно 2.5 пута у односу на контролни узорак у спектралној области која одговара емисији триптофана. Детаљним испитивањем просторне дистрибуције флуоресцентног сигнала установљено је да долази до интернализације наночестица кроз ћелијски зид, чиме је показано да се наночестице

злата функционализоване триптофаном могу користити као флуоресцентни маркери за детекцију ових ћелијских линија. Овај правац истраживања настављен је и за случај полиморфних једноћелијских гљива *Candida albicans* које су инкубиране са наночестицама злата функционализованим рибофлавином. За разлику од бактерија, ове ћелијске културе биле су фиксиране глутералдехидом који је сам флуоресцентан у ултраљубичастој области и значајно доприноси аутофлуоресценцији ћелија. Међутим, с обзиром да рибофлавин располаже са два енергетска нивоа која обезбеђују флуоресценцију у испитиваној области електромагнетног зрачења, показано је да се флуоресценција AuRb наноструктура може јасно раздвојити од аутофлуоресценције биолошког система. Уочено је да AuTrpRb наноструктуре претежно интерагују са ћелијским зидовима микроорганизама, али да не долази до интернализације.

Детаљно испитивање фотоексцитационих процеса AuTrpRb наноструктура довело је успешне локализације ових честица у NuH7.5 ћелијама рака јетре. Наиме, услед резонантног трансфера енергије између триптофана и рибофлавина, а који је додатно појачан присуством наночестица злата, флуоресцентни сигнал који је потицао од AuTrpRb наноструктура унутар ћелија рака испољавао је другачију временску зависност у односу на флуорофоре већ присутне у ћелијама. Кандидаткиња је развила нов метод анализе експерименталних резултата везаних за динамику промене флуоресцентног сигнала која је омогућила одређивање локација преферентне акумулације наночестица у ћелијама, иако су саме наночестице мање од просторне резолуције флуоресцентних слика. Резултати приказани у овој докторској дисертацији представљају значајан помак у студији биоимејџинга појединачних ћелија, као и у примени наноструктура у биомедициским истраживањима.

### 3. Списак публикација

#### Публикације везане за докторску дисертацију

1. **J. D. Pajović**, R. Dojčilović, D. K. Božanić, V. V. Vodnik, S. Dimitrijević-Branković, S. Kaščáková, M. Réfrégiers, M. Markelić, V. Djoković: Deep UV fluorescence imaging study of *Candida albicans* cells treated with gold-riboflavin hydrocolloids. *Optical and Quantum Electronics* 48, 311 (2016) (IF =1.055) ISSN: 0306-8919
2. **J. D. Pajović**, R. Dojčilović, D. K. Božanić, S. Kaščáková, M. Réfrégiers, S. Dimitrijević- Branković, V. V. Vodnik, A. R. Milosavljević, E. Piscopiello, A. S. Luyt, V. Djoković: Tryptophan-functionalized gold nanoparticles for deep UV imaging of

microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 135, 742 (2015) (IF = 3.902)  
ISSN: 0927-7765

### Остале публикације

3. J. Vergalli, E. Dumont, **J. D. Pajović**, B. Cinquin, L. Maigre, M. Masi, M. Réfrégiers, J-M. Pagès: Spectrofluorimetric quantification of antibiotic drug concentration in bacterial cell for the characterization of translocation across bacterial membranes. *Nature Protocols* 13, 1348 (2018) (IF = 12.423) ISSN: 1754-2189
4. R. Dojčilović, **J. D. Pajović**, D. K. Božanić, U. Bogdanović, V. V. Vodnik, S. Dimitrijević- Branković, M. G. Miljković, S. Kaščakovà, M. Réfrégiers, V. Djoković: Interaction of amino acid- functionalized silver nanoparticles and *Candida albicans* polymorphs: A Deep-UV fluorescence imaging study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 155, 341 (2017) (IF = 3.902) ISSN: 0927- 7765
5. A. Allam, L. Maigre, J. Vergalli, E. Dumont, B. Cinquin, R. Alves de Sousa, **J. Pajović**, E. Pinet, N. Smith, J-P. Herbeuval, M. Réfrégiers, I. Artaud, J-M. Pagès: Microspectrofluorimetry to dissect the permeation of ceftazidime in Gram-negative bacteria. *Scientific Reports* 7, 986 (2017) (IF = 4.259) ISSN: 2045-2322
6. J.Vergalli, E. Dumont, B. Cinquin, L. Maigre, **J. Pajović**, E. Bacqué, M. Mourez, M. Réfrégiers, J-M. Pagès: Fluoroquinolone structure and translocation flux across bacterial membrane. *Scientific Reports* 7, 9821 (2017) (IF = 4.259) ISSN: 2045-2322
7. M. Masi, E. Dumont, J. Vergalli, **J. Pajović**, M. Réfrégiers, J-M. Pagès, Fluorescence enlightens RND pump activity and the intrabacterial concentration of antibiotics, *Research in Microbiology*, in press (2017) (IF = 2.549) ISSN: 0923-2508
8. R. Dojčilović, **J. D. Pajović**, D. K. Božanić, V. V. Vodnik, S. Dimitrijević-Branković, A. R. Milosavljević, S. Kaščakovà, M. Réfrégiers, V. Djoković: Fluorescence nanoprobe for single bacterium tracking: Functionalization of silver nanoparticles with tryptophan to probe the nanoparticle accumulation with single cell resolution. *Analyst* 141, 1988 (2016) (IF = 4.107) ISSN: 0003-2654
9. V. P. Pavlović, V. B. Pavlović, B. Vlahović, D. K. Božanić, **J. D. Pajović**, R. Dojčilović, V. Djoković: Structural properties of composite of polyvinylidene fluoride and mechanically activated BaTiO<sub>3</sub> particles. *Physica Scripta* T157, 014006 (2013) (IF = 1.194) ISSN: 1402-4896
10. N. Nedeljković, D. Božanić, R. Dojčilović, **J. Pajović**: Self-consistent procedure for treatment of the ionization dynamics of Rydberg atoms approaching solid surfaces in the electric field, *Publications of the Astronomical Observatory of Belgrade*, 89, pp. 113 – 116 (2010), ISSN : 0373-3742

### ЗАКЉУЧАК

На основу изложеног, комисија закључује да резултати кандидаткиње Јелене Пајовић приказани у оквиру ове докторске дисертације представљају оригиналан научни допринос у области физике кондензоване материје, а посебни у области нанонаука.



Изузетан допринос ове дисертације је испитивање фотоелектронских особина наночестичних система у гасној фази, као и нови приступ у локализацији флуоресцентних наноструктура применом оптичке микроскопије у ултраљубичастом делу електромагнетног спектра. Кандидаткиња је објавила два рада у међународним часописима са импакт фактором изнад 1, који су у директној вези са њеном тезом. Сходно томе, комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Јелене Пајовић под називом *Biomolecule functionalized gold nanoparticles: photoexcitation processes and application in fluorescence microscopy* (Златне наночестице функционализоване биомолекулима: испитивање фотоекситационих процеса и примена у флуоресцентној микроскопији), и предлаже наставно-научном већу Физичког факултета Универзитета у Београду да прихвати и одобри њену јавну одбрану, чиме би били испуњени сви услови да кандидаткиња стекне звање доктора физике.

У Београду, 15.07.2018. године,

Чланови Комисије за преглед и оцену докторске дисертације:



Др Душан Божанић, ИНН Винча



Др Владимир Токовић, ИНН Винча

Доц. Др Славица Малетић, Физички факултет

Проф. Др Јаблан Дојчиловић, Физички факултет