

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

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj dana 09.03.2017. godine, broj 5940/09, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Fotodinami ko citotoksi no i antibakterijsko dejstvo grafenskih kvantnih ta aka *in vitro*”

kandidata **dipl. molekularnog biologa i fiziologa Biljane Risti** , zaposlene na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor doktorske disertacije je prof. dr Vladimir Trajkovi , a komentor prof. dr Ivana Daki .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Nau ni sar. dr Verica Paunovi , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Nau ni sar. dr Maja Misirki Marjanovi , Institut za biološka istraživanja „Siniša Stankovi ” Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dejan Baski , Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu.

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija kandidata Biljane Risti pod nazivom „Fotodinami ko citotoksi no i antibakterijsko dejstvo grafenskih kvantnih ta aka *in vitro*” napisana je na

ukupno 87 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 25 slika i jedna tabela. U poslednjem poglavlju je iznet pregled literature citirane u doktorskoj disertaciji koji sadrži 179 navoda. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena imena korišćenih u tekstu. Struktura i kompozicija rada u celini sadrže sve elemente i zadovoljavaju sve kriterijume doktorske disertacije.

U **uvodu** su ukratko opisane struktura i karakteristike kvantnih tačaka, kao i struktura, karakteristike i otkriće molekula grafena za koje su fizičari Konstantin Novoselov i Andrej Gejm dobili Nobelovu nagradu 2010. godine. Dalje, opisane su metode sinteze i struktura grafenskih kvantnih tačaka (GKT) koje uslovljavaju njihove specifične fizičko-hemijske osobine (fotoluminiscencija, fotostabilnost, biokompatibilnost i dr.). Posebna pažnja posvećena je njihovoj primeni u biomedicini.

Jedna od najvažnijih osobina GKT za primenu u biomedicini je to što poseduju i prooksidativni i antioksidativni potencijal. Sposobnost GKT da proizvode reaktivne kiseonikne vrste (RKV), uključujući i singletni kiseonik, nakon ekscitacije plavom svetlošću omogućava njihovu primenu u fotodinamičkoj terapiji (FDT), gde su karakteristike i biomedicinska primena takođe detaljno opisane. Naravno je istaknut značaj FDT kao alternativnog pristupa u terapiji tumora i bakterijskih infekcija, imajući u vidu rezistenciju tumorskih ćelija i bakterija na konvencionalne hemioterapeutike i antibiotike. Osim toga, prikazane su osnovne karakteristike tumora i mehanizmi njihovog nastanka, pri čemu je posebna pažnja posvećena gliomima, najčešćim i najletalnijim tumorima mozga. Detaljno su definisani molekularni mehanizmi u indukciji apoptoze i autofagije, sa posebnim osvrtom na ulogu oksidativnog stresa, a analizirana je i uloga autofagije u smrti tumorskih ćelija.

Imajući u vidu da fotodinamičko dejstvo GKT na ćelije tumora i bakterije do sada nije ispitivano, postavljeni su sledeći **ciljevi** ovog istraživanja: (1) ispitati sposobnost GKT da nakon fotoekscitacije produkuju RKV, (2) ispitati fotodinamičko antitumorsko i antibakterijsko dejstvo GKT u *in vitro* uslovima i (3) ispitati mehanizme odgovorne za

foto-dinami ku citotoksi nost i antibakterijsko dejstvo GKT (tip elijske smrti i uloga oksidativnog stresa).

U poglavlju **Materijal i metode** opisani su uslovi pod kojima su eksperimenti izvedeni i slede e eksperimentalne metode: a) sinteza GKT elektrohemijskom oksidacijom grafita, kao i njihova karakterizacija mikroskopijom atomskih sila, transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM), fluorescentnom spektroskopijom; b) gajenje elija humanog glioma U251; c) tretiranje elija suspenzijama razli itih koncentracija GKT u razli itim vremenskim intervalima; d) odre ivanje vijabilnosti elija merenjem aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze, odre ivanjem broja adherantnih elija nakon bojenja kristal violetom, odre ivanje vijabilnosti elija merenjem aktivnosti kisele fosfataze, odnosno citotoksi nosti merenjem aktivnosti laktat dehidrogenaze; e) utvr ivanje tipa i mehanizama elijske smrti na proto nom citofluorimetru analizom apoptotske fragmentacije DNK, translokacije fosfatidilserina i aktivacije kaspaza, f) merenje produkcije RKV, posebno singletnog kiseonika, proto nom citofluorimetrijom, odnosno metodom EPR u sistemu bez elija i sa elijama; g) ispitivanje indukcije autofagije i odre ivanje njene uloge u citotoksi nosti GKT imunoblot analizom i RNK interferencijom; h) tretiranje suspenzija bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* razli itim koncentracijama GKT u razli itim vremenskim intervalima; i) odre ivanje vijabilnosti bakterija primenom fluorescentnog eseja za detekciju o uvanosti integriteta elijske membrane, kao i primenom standardne metode za brojanje bakterijskih kolonija na hranljivim podlogama; j) odre ivanje produkcije RKV kod tretiranih bakterija primenom fluorescentnog eseja za detekciju RKV. Kona no, opisane su statisti ke metode koriš ene za obradu dobijenih podataka.

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

U poglavlju **Diskusija** kandidat je na sveobuhvatan i detaljan na in povezao svoje rezultate sa rezultatima drugih autora. Na osnovu toga, kandidat je izneo svoje zaklju ke koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije i opisao njihov potencijalni zna aj u terapiji tumora i bakterijskih infekcija.

U poglavlju **Zaključci** sumirani su svi rezultati dobijeni u ovoj disertaciji, koji u potpunosti odgovaraju ciljevima postavljenim na početku izrade teze.

Korištena **literatura** sadrži spisak od 179 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U poglavlju **Rezultati** kandidat je jasno i dokumentovano prikazao različite fizičko-hemijske karakteristike GKT sintetisanih elektrohemijom oksidacijom grafita. Utvrđene su dimenzije sintetisanih GKT, kao i njihova kristalna struktura. Analizom fotoluminiscentnih spektara je pokazano da GKT imaju najveći intenzitet luminiscencije u vidljivom delu spektra, dok su UV-Vis apsorpcioni spektri pokazali da je vrednost apsorpcije GKT bila najviša u UV oblasti. Pokazano je da GKT nakon fotoekscitacije plavom svetlošću u produkuju RKV, uključujući i singletni kiseonik, što je dovelo do oksidativnog stresa i smrti U251 ćelija humanog glioma. Ispitivana je citotoksičnost fotoekscitiranih GKT na U251 ćelijama, pri čemu je različitim testovima utvrđeno da fotoekscitirane GKT značajno smanjuju broj ćelija, dok pojedinačni tretmani GKT ili plavom svetlošću u nemaju uticaja na vijabilnost ćelija. Ćelijska smrt indukovana fotoekscitiranim GKT pokazivala je morfološke i biohemijske karakteristike apoptoze, što je pokazano eksternalizacijom fosfatidil-serina, aktivacijom kaspaza i DNK fragmentacijom. Upotrebom antioksidansa L-askorbinske kiseline, koji je doveo do oporavka ćelija tretiranih fotoekscitiranim GKT, ukazano je na ključnu ulogu RKV u citotoksičnom delovanju fotoekscitiranih GKT. Da bi se ispitala intracelularna lokalizacija fotoekscitiranih GKT, tretirane ćelije su analizirane na konfokalnom mikroskopu i TEM i utvrđeno je prisustvo GKT u autofagozomima i autolizozomima. U skladu s tim, imunoblot analizom je detektovana lipidovana forma LC3-II proteina, karakteristična za membranu autofagozoma, kao i smanjenje nivoa autofagnog adaptera i supstrata autofagne razgradnje SQSTM1/p62 proteina u ćelijama tretiranim fotoekscitiranim GKT. Ćeljska inaktivacija esencijalnog autofagnog proteina LC3B delimično je oporavila vijabilnost ćelija tretiranih fotoekscitiranim GKT, što je ukazalo na citotoksičnu ulogu autofagije.

U drugom delu poglavlja opisan je antibakterijski efekat GKT ozra enih plavom svetloš u na dve vrste bakterija, meticilin-rezistentni *S. aureus* i *E. coli*. Pokazano je da pojedina ni tretmani GKT ili plavom svetloš u nisu doveli do indukcije oksidativnog stresa i smrti bakterija. Baktericidni efekat fotoekscitiranih GKT pokazan je smanjenjem broja bakterijskih kolonija na odgovaraju im hranljivim podlogama, pove anjem unosa propidijum jodida u bakterijske elije sa ošte enom membranom, kao i vizuelizacijom morfoloških promena pomo u mikroskopije atomskih sila. Indukcija oksidativnog stresa kod bakterija tretiranih fotoekscitiranim GKT potvr ena je bojenjem redoks senzitivnim fluorohromom dihidrorodaminom 123. Tako e, pokazano je da su tumorske i netransformisane elije (primarni splenociti miša) sli no osetljive na fotodinami ku toksi nost GKT, ali i da su obe vrste eukariotskih elija rezistentnije na tretman u odnosu na bakterijske, tj. prokariotske elije.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati kandidata su detaljno upore eni sa podacima iz literature. Pore enje rezultata sa rezultatima ranijih studija govori da su postignuti rezultati u saglasnosti sa dosadašnjim istraživanjima, sa jasnim isticanjem novih saznanja u vezi sa postavljenim istraživa kim pitanjima.

U ovoj disertaciji jasno je pokazano da GKT ispoljavaju izuzetne opti ke osobine poput podesive fotoluminiscencije i izražene fotostabilnosti, što ih ini dobrim kandidatima za potencijalnu primenu u FDT. Analizom fotoluminiscentnih spektara je pokazano da GKT imaju najve i intenzitet luminiscencije u vidljivom delu spektra, dok je vrednost apsorbancije GKT bila najviša u UV oblasti, što je u skladu sa rezultatima Jiang i sar. (Nanoscale. 2013; 5:1137-42). Tako e, kao što je o ekivano, imaju i u vidu rezultate Sk i sar., prisustvo defekata na površini i cik-cak oblik ivice GKT su prouzrokovali pomeraj fotoluminiscentne emisije u crveni deo vidljivog spektra (J Mat Chem C. 2014; 34:6954).

Za fotostimulaciju GKT koriš ena je plava svetlost koja nije imala uticaj na vijabilnost elija glioma, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima Oplandera i sar. koji

su pokazali da plavo svetlo nema toksi an efekat na humane dermalne fibroblaste (J Photochem Photobiol B. 2011; 103:118-125).

S druge strane, istraživanja su pokazala da dugotrajno izlaganje plavoj svetlosti može biti toksi no za retinocite (Sci Rep. 2014; 4:223) sugerišu i da je toksi nost plave svetlosti elijski specifi na. U ovoj disertaciji je pokazano da samostalni tretmani plavom svetloš u i GKT nisu bili toksi ni za U251 elije humanog glioma i primarne splencite, što je bitno za primenu u FDT. Tako e, u mnogobrojnim studijama drugih autora je potvr eno da GKT u odsustvu ekscitacije svetloš u ne ispoljavaju citotoksi an efekat na razli ite tumorske elije (HeLa, MG-63, A549, MCF-7, MDA-MB-231 i T47D) (ACS Nano. 2016; 10:8690-9), kao ni na stem elije (Nanoscale. 2014; 6:5799-806). Sa druge strane, u ovoj doktorskoj disertaciji, pokazano je da su nakon izlaganja plavoj svetlosti GKT ispoljile snažno citotoksi no dejstvo na elije U251 glioma. Dodatno, u ovoj disertaciji je utvr eno da GKT nakon fotoekscitacije plavom svetloš u produkuju $^1\text{O}_2$ i druge RKV, što je posledica prisustva strukturnih defekata i slobodnih radikala na njihovoj površini, a što je u skladu sa istraživanjima Christensen i sar. (J Biomed Nanotechnol. 2011; 7:667-76). Tako e, utvr ena je sposobnost fotoekscitiranih GKT da indukuju apoptozu, budu i da je prime eno premeštanje fosfatidil-serina sa unutrašnje na spoljašnju stranu elijske membrane, aktivacija kaspaza, fragmentacija DNK, kao i morfološke promene karakteristi ne za apoptozu (zaokrugljivanje, smanjenje volumena elija i odvajanje elija od podloge) (Cell Death Differ. 2009; 16:1093-107). Imaju i u vidu da je tretman antioksidansom L-askorbinskom kiselinom smanjio citotoksi no delovanje GKT ozra enih plavom svetloš u, može se pretpostaviti da je u osnovi fotodinami ke citotoksi nosti GKT upravo oksidativni stres (J Am Coll Nutr. 2003; 22:18-35). Ovakva pretpostavka podržana je rezultatima Qin i sar. koji su utvrdili da je apoptoza koju indukuju GKT u makrofagima zavisna od pove ane produkcije RKV (Toxicology. 2015; 327:62-76). Osim toga, u studijama drugih autora produkcija RKV je predložena kao mehanizam citotoksi nosti i za druge nanomaterijale (Nanoscale Res Lett. 2013; 8:198; J Mat Chem B. 2013; 1:6485). Iako se zna da su oksidativni stres i indukcija apoptoze po pravilu udruženi sa promenom membranskog potencijala mitohondrija, fotoekscitirane GKT nisu indukovale depolarizaciju mitohondrija (Apoptosis. 2007; 12:913-22). U skladu sa rezultatima ove

disertacije koji pokazuju da su GKT bile akumulirane u citoplazmi tretiranih elija, ali ne i u nukleusu, i radovi drugih autora su pokazali isto (Adv Healthc Mater. 2013; 2:1613-19). U saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija u kojima je pokazano da druge nano estice indukuju autofagiju u tumorskim elijama, u ovoj disertaciji je po prvi put pokazana sposobnost fotoekscitiranih GKT da indukuju autofagiju u elijama glioma (Autophagy. 2007; 3:278-81). Kako je primećeno da je vijabilnost elija glioma bila značajno veća nakon genskog utišavanja LC3B, esencijalnog gena za autofagiju, može se zaključiti da autofagija ima citotoksičnu ulogu i da doprinosi apoptozi. Slično ovome, u elijama makrofaga pokazano je da GKT izazivaju citotoksičnu autofagiju na doznom i vremenski zavisanoj osnovi (Toxicology. 2015; 327:62-76).

Drugi deo ove disertacije se bavi analizom antibakterijskog efekta fotoekscitiranih GKT na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, *S. aureus* i *E. coli*. Pokazano je da plava svetlost, kao i nefunkcionalizovane GKT u odsustvu fotoekscitacije nisu imali baktericidno dejstvo na *S. aureus* i *E. coli*, što je u skladu sa rezultatima Sun i sar. (ACS Nano. 2014; 8:6202-10). S druge strane, istovremeni tretman bakterija plavom svetlošću u GKT indukovao je značajno povećanje broja bakterija koje su fluorescirale crvenom bojom nakon bojenja propidijum jodidom, što ukazuje na smanjenje vijabilnosti bakterijskih elija zbog oštećenja citoplazmatske membrane. U skladu sa ovom pretpostavkom, primećena je promena morfologije, povećanje visine i površinske hrapavosti citoplazmatske membrane obe ispitivane vrste nakon tretmana fotoekscitiranim GKT. Ovi rezultati podržani su rezultatima Hui i sar. koji su pokazali da površina bakterija *S. aureus* nakon tretmana sa C₆₀-GKT postaje značajno hrapavija i prekrivena karakterističnim ispupčenjima veličine nekoliko nm (ACS Appl Mater Interfaces. 2015; 8:20-5). U ovoj disertaciji je pokazano da je *E. coli* ispoljila veću otpornost na toksično dejstvo fotoekscitiranih GKT u odnosu na *S. aureus*. Takođe, uočeno je da obe bakterije pokazuju povećanu tendenciju ka stvaranju agregata posle izlaganja fotoekscitiranim GKT, što je bilo u skladu opisanim promenama morfologije bakterijskih elija pri delovanju drugih antibakterijskih agenasa, kao što su azot oksid, apolipoforin III i jednoslojne ugljenične nanotube (Acta Biomater. 2009; 5:1405-15; Biochim Biophys Acta. 2013; 1828:1449-56). Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj disertaciji moglo se pretpostaviti da fotoekscitirane GKT ubijaju bakterije tako što

fotodinami ki narušavaju integritet citoplazmatske membrane, ulaze u bakterijsku eliju i indukuju oksidativni stres. U svetlu primene GKT u FDT, važno je ista i da su rezultati ove doktorske disertacije pokazali da su splenociti miša manje osetljivi na delovanje fotoekscitiranih GKT od bakterijskih elija, što se može objasniti injenicom da eukariotske elije imaju složeniji odbrambeni odgovor na oksidativni stres (Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2011; 153:175-90).

D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije

1. Markovic Z, **Ristic B**, Arsikin K, Klisic D, Harhaji-Trajkovic L, Todorovic-Markovic B, Kepic D, Kravic-Stevovic T, Jovanovic S, Milenkovic M, Milivojevic D, Bumbasirevic V, Dramicanin M, Trajkovic V. Graphene quantum dots as autophagy-inducing photodynamic agents. Biomaterials. 2012; 33:7084-92.
2. **Ristic B**, Milenkovic M, Dakic I, Todorovic-Markovic B, Milosavljevic M, Budimir M, Paunovic V, Dramicanin M, Markovic Z, Trajkovic V. Photodynamic antibacterial effect of graphene quantum dots. Biomaterials. 2014; 35:4428-35.

E) Zaklju ak (obrazloženje nau nog doprinosa)

Doktorska disertacija kandidata Biljane Risti pod nazivom: „Fotodinami ko citotoksi no i antibakterijsko dejstvo grafenskih kvantnih ta aka *in vitro*” predstavlja originalan rad iz oblasti eksperimentalne biomedicine. Zna aj ove doktorske disertacije je u tome što je prvi put pokazano da GKT nakon ekscitacije plavom svetloš u ispoljavaju snažno antitumorsko i antibakterijsko dejstvo, detaljno razjašnjavaju i mehanizme u osnovi ovih procesa. FDT zasnovana na izlaganju GKT plavom svetloš u zanimljiva je za dalja istraživanja kao nov pristup u terapiji tumora, naro ito ukoliko se ima u vidu da za ve inu tumora još uvek ne postoji efikasna terapija. Osim toga, s obzirom na porast u estalosti infekcija uzrokovanih sojevima bakterija koje pokazuju rezistenciju na veliki broj antibiotika, neophodno je dalje ispitivanje fotoekscitiranih GKT kao potencijalnih antibakterijskih agenasa.

F) Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije

Doktorska disertacija pod nazivom „Fotodinami ko citotoksi no i antibakterijsko dejstvo grafenskih kvantnih ta aka *in vitro*” kandidata Biljane Risti , ura ena je prema svim principima nau nog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena i dobro osmišljena. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaklju ci.

Na osnovu svega navedenog i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, Komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju kandidata dipl. molekularnog biologa Biljane Risti i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 15.06.2017.

Mentor:

Prof. dr Vladimir Trajkovi

Komentor:

Prof. dr Ivana Daki

lanovi Komisije:

N.sar. dr Verica Paunovi

N.sar. dr Maja Misirki Marjanovi

Prof. dr Dejan Baski