

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На II редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 7. новембра 2024. године, на основу молбе ментора, др Драгане Митић Ћулафић, научног саветника, Универзитет у Београду - Биолошки факултет и др Магдалене М. Стевановић, научног саветника, Институт техничких наука САНУ, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Нине Томић, докторанда, истраживача-сарадника на Институту техничких наука САНУ, под насловом: „**Композитни материјал базиран на наночестицама ресвератрола и селена: синтеза, карактеризација и биолошка активност**“, у саставу: проф. др Биљана Николић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, проф. др Славиша Станковић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Ненад Филиповић, виши научни сарадник, Институт техничких наука САНУ, др Ина Гајић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Медицински факултет и др Маја Кузмановић, научни сарадник, Институт техничких наука САНУ.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Нине Томић, под називом „**Композитни материјал базиран на наночестицама ресвератрола и селена: синтеза, карактеризација и биолошка активност**“, је истраживање проистекло из вишегодишњег испитивања почев од синтезе и карактеризације наночестица ресвератрола, селена и њиховог композита, па до испитивања њихових биолошких активности, и то антибактеријске, антибиофилм, цитотоксичне и генотоксичне.

Ова дисертација је највећим делом урађена у лабораторијама Института техничких наука САНУ и на Катедри за микробиологију Универзитета у Београду – Биолошког факултета. Карактеризација скенирајућом електронском микроскопијом је урађена у лабораторијама Универзитета у Београду – Технолошког факултета, а анализа RT PCR методом је делом спроведена у просторијама Центра за хуману молекуларну генетику, Универзитета у Београду – Биолошког факултета.

Докторска дисертација садржи: насловну страну на српском и енглеском језику, податке о ментору и члановима комисије, изјаву захвалности, сажетак са кључним речима на српском и енглеском језику, списак скраћеница, садржај, текст по поглављима, списак литературе и прилоге. Докторска дисертација је написана на 144 стране и подељена је на 8 поглавља: Увод (22 стране), Циљ рада (2 стране), Материјал и методе (35 страна), Резултати (44 стране), Дискусија (17 страна), Закључци (2 стране), Литература (17 страна) и Прилози (5 страна). Докторска дисертација садржи 75 слика, 9 табела и 202 библиографске јединице. Поред наведеног, теза садржи и Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

### **Анализа докторске дисертације**

Поглавље „Увод“ ове докторске дисертације је подељено на седам потпоглавља и садржи адекватне литературне податке значајне за разумевање теме докторске дисертације. У оквиру „Увода“, кроз четири потпоглавља, осим основног прегледа целе дисертације, датог у првом потпоглављу, кандидаткиња такође објашњава појмове као што су *биомедицина*, односно примена биолошких и биохемијских принципа зарад решења проблема у области патофизиологије, и *биоматеријали*, тј. материјали намењени за репарацију или замену ткива или органа. Даље, представљени су основни проблеми у овим областима због којих су потребна даља истраживања и усавршавање. Овде је посебна пажња посвећена истицању значаја потенцијалне контаминације биоматеријала микроорганизмима, што може имати значајне импликације на људско здравље. Објашњена је опасност од резистенције на антибиотике, као и од формирања биофилма као сесилне, високо отпорне животне форме микроорганизма. Појава биофилма представља једну од најчешћих компликација код примене биоматеријала. Укратко је описана биологија бактеријских врста које су познате као изазивачи компликација код примене биоматеријала

и које су, као такве, коришћене у оквиру овог истраживања. У питању су биле бактерије рода *Staphylococcus* (конкретно врсте *S. aureus* и *S. epidermidis*, чије су основне разлике такође описане), као и *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*.

У даљим потпоглављима „Увода“, кандидаткиња се бави основним проблемима због којих се унапређују биоматеријали. Међу њима је оксидативни стрес, који је уз инфламацију још један од основних разлога за неуспех примене вештачких материјала у организму. Оксидативни стрес је дефинисан као дисбаланс настанка и уклањања слободних радикала, услед кога може доћи до оштећења ћелија у окружењу примењеног биоматеријала, али и самог биоматеријала. Описане су различите врсте слободних радикала, начини настајања и механизми њиховог дејства. Посебно су истакнути супероксидни ањон и друге реактивне кисеоничне врсте, као и механизам липидне пероксидације. Следећи сегмент објашњава појам ћелијске смрти, различите узрочне факторе који јој доприносе као и механизме којима се она остварује.

У четвртом потпоглављу „Увода“, „Последња реч технологије на пољу биоматеријала“, наведени су тренутно широко коришћени биоматеријали, као што су титанијум, нерђајући челик, алуминијум оксид (алумина) и други, који су већински биоинертни. Уз то, објашњен је нови смер истраживања окренут ка дизајну биоактивних материјала, у циљу сузбијања адхезије патогених бактерија и смањења оксидативног стреса, поткрепљен прегледом новије литературе на ту тему.

Посебан осврт у овом потпоглављу дат је на нанотехнологију, као релативно нову област науке и технологије, која се бави изучавањем, оптимизацијом и применом материјала и структура на нанометарској скали. Истакнути су допринос и примена наночестица и других наноструктурираних материјала у биомедицини и науци о биоматеријалима. Наночестице одликују високе вредности односа површине и запремине, што им може дати посебне механичке, физичкохемијске, електричне и магнетне особине. У нанобиотехнологији се, међутим, још више истичу нановлакна, због своје применљивости у дизајну тродимензионалних структура. Даље, наноматеријали због својих физичкохемијских карактеристика генерално пружају предности у третману биофилма, што је описано у посебном сегменту текста.

Због потребе за мултифункционалношћу и ефикаснијим остварењем конкретне функције, настали су композитни материјали састављени из више од једне компоненте, као што је и материјал испитиван у оквиру ове докторске дисертације. У последњем одељку из потпоглавља „Нанотехнологија у инжењерству биоматеријала“ описани су нанокompозити, као и примери за употребу оваквих материјала.

Осим нанотехнологије, међу новијим смеровима у развоју биоматеријала, у оквиру четвртог потпоглавља „Увода“, описан је и концепт носача, тј. “скафолда” за раст ћелија, као биоматеријала који поспешују регенерацију ткива. Даље, описани су разлози за све ширу употребу антиоксиданата као додатка биоматеријалима, у циљу умањења оксидативног стреса.

Пето потпоглавље „Увода“ бави се ресвератролом. Ресвератрол је полифенол из породице стилбена који поседује бројне биолошке активности, међу њима антиоксидативно, антибактеријско, антифунгално, али такође и кардиопротективно, антиканцерско, анти-инфламаторно и неуропротективно дејство. Међутим, биодоступност ресвератрола је ниска, што отежава његову примену и што је довело до развоја различитих наноформулација. У ту сврху су већ испробани различити природни и синтетички полимери, као и системи базирани на липидима, при чему су за ткивно инжењерство посебно интересантна нановлакна ресвератрола, као и системи са што мањом употребом токсичних и скувих хемикалија током синтезе.

У шестом потпоглављу „Увода“ описан је есенцијални микронутријент селен и његови извори у природи, у виду неорганских и органских једињења. Наночестице селена су један од система за побољшање биодоступности селена који у последње време постиже све већу популарност.

Последње, седмо потпоглавље „Увода“, “Синергизам и токсичност као аспект у примени нанобиоматеријала и композита”, бави се основама употребе више од једне активне супстанце. У њему је изнета идеја да биљна једињења и наночестице, који делују плејотропно, могу надмашити бактеријску способност за прилагођавање и развој резистенције на агенсе са једним механизмом дејства, те испољити синергистичко дејство. Посебна пажња је посвећена опису аспеката токсичности како полифенола, тако и наночестица.

У поглављу „Циљ рада“ кандидаткиња наводи да су основни циљеви у овом истраживању били добијање наночестица ресвератрола у форми чије карактеристике по предностима превазилазе основни облик, даље унапређење овог материјала формирањем композита са наночестицама селена, истраживање њихових биолошких активности и биокомпатибилности, као и процена њиховог потенцијала за облагање скафолда од биостакла.

Главни циљеви састојали су се од наведених подциљева:

1. Синтеза наночестица ресвератрола (ResNPs).
2. Синтеза композитног материјала, базираног на наночестицама ресвератрола у комбинацији са наночестицама селена (ResSeNPs).
3. Физичкохемијска карактеризација композита ResSeNPs и његових компоненти и утврђивање њихове стабилности:
  - (а) применом оптичке и електронске микроскопије;
  - (б) применом UV-Vis спектроскопије;
  - (в) применом инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (FTIR);
  - (г) применом рендгенске кристалографије (XRD);
  - (д) применом диференцијалне скенирајуће калориметрије (DSC);
4. Процена антиоксидативног потенцијала композита ResSeNPs и његових компоненти, утврђивањем способности:
  - (а) неутрализације слободних радикала;
  - (б) редуковања јона гвожђа;
  - (в) инхибиције липидне пероксидације.
5. Процена антибактеријског потенцијала композита ResSeNPs и компоненти композита на одабраним бактеријским сојевима из референтне базе и одговарајућих клиничких изолата који су идентификовани као чести колонизатори имплантата:
  - (а) утврђивање минималних инхибиторних и бактерицидних концентрација;
  - (б) утврђивање утицаја на потенцијал формирања биофилма;
  - (в) процена утицаја на експресију гена везаних за развој биофилма код одабраних бактерија.

6. Процена биокомпатибилности композита ResSeNPs и његових компоненти помоћу тестова цитотоксичности и генотоксичности на одабраним хуманим ћелијским линијама, као и одабраног теста *in vivo* токсичности:

- (а) утврђивање нецитотоксичних концентрација;
- (б) процена промена у морфологији третираних ћелија;
- (в) процена генотоксичности, кроз праћење потенцијала индукције прекида и алкално лабилних места на ДНК;
- (г) процена потенцијала за индукцију оксидативног стреса, преко мерења промене у количини супероксидног аниона у хуманим ћелијама;
- (д) процена ефекта на потенцијал антиоксидативне одбране, утврђивањем утицаја на ензимску компоненту овог система - ензим каталазу;
- (ђ) утврђивање токсичног потенцијала *in vivo* на моделу *Artemia salina*.

7. Процена потенцијала композита ResSeNPs и компоненти композита за облагање скафолда од биостакла.

Треће поглавље, „**Материјал и методе**“, састављено је из два потпоглавља. У потпоглављу „**Материјал**“, описане су честице ресвератрола и наночестице селена које су коришћене у синтези композита, односно њихове формулације са списком реагенаса. Такође су описани раствори коришћени за тестове на антиоксидативни ефекат, као и сав материјал за биолошке тестове, међу којима су бактеријски сојеви и раствори и материјали потребни за рад са бактеријама (раствори, хранљиве подлоге, као и прајмери, китови и реагенси за молекуларне методе), хумане ћелијске линије и сав материјал потребан за рад са њима и извођење тестова у којима се користе хумане ћелије. Обезбеђени су и подаци о пореклу скафолда од биостакла који су облагани композитом и његовим компонентама. На крају, наведени су и тест организми *Artemia salina* и састојци раствора потребних за рад са њима. У потпоглављу „**Методе**“, изнети су детаљи о процедурама синтезе честица ресвератрола налик нано-тракама (ResNPs), суспензије наночестица селена (SeNPs) и композита на бази ресвератрола и наночестица селена (ResSeNPs), методе њихове физичкохемијске карактеризације, испитивања биохемијске и биолошке активности. Уз опис растварач-нерастварач синтезе ResNPs, у којој нису коришћене додатне токсичне хемикалије, стабилизатори и носачи, наведени су и различити параметри процесовања ових

честица који су испитани. SeNPs су синтетисане редукцијом натријум селенита уз помоћ аскорбинске киселине као редукујућег средства и албумина говеђег серума као стабилизатора. Описане су различите методе примењене за синтезу композита, међу којима је одабрана хомогенизација суспензија готових честица, као најподеснија за даљи рад.

Методе карактеризације, односно UV-Vis и FTIR спектроскопија, оптичка и електронска микроскопија (FESEM), диференцијална скенирајућа калориметрија (DSC) и рендгенска кристалографија (XRD), објашњене су након описа поступака синтезе. Уз њих, описано је испитивање асоцијације SeNPs и ResNPs у композиту. Одељак који се тиче испитивања антиоксидативне активности обухвата опис неколико метода базираних на различитим механизмима остваривања антиоксидативне активности, а које укључују тест способности неутрализације слободних радикала, тј. 1,1-дифенил-2-пикрил-хидразил (DPPH) тест, затим тест одређивања инхибиције липидне пероксидације (TBA тест), и најзад тест потенцијала супстанци да редукују јоне гвожђа (FRAP тест).

Одељак потпоглавља „Методе“ под називом „Биолошка активност“ обухвата сегмент „Испитивање биолошке активности на бактеријским ћелијама“, у коме су описане методе гајења и одржавања бактеријских култура, метода одређивања антимикробне активности микродилуционом методом, одређивања антибиофилм активности бојењем кристал виолетом, као и методе потребне за молекуларне анализе. Ове методе, примењене са циљем утврђивања утицаја композита и компоненти на експресију одабраних гена укључених у формирање биофилма, укључивале су екстракцију геномске ДНК из бактеријских ћелија, умножавање ДНК фрагмената помоћу PCR (*Polymerase Chain Reaction*), хоризонталну електрофорезу ДНК у агарозном гелу, и RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) анализу са претходним корацима (изолација и пречишћавање РНК, провера чистоће добијене РНК, припрема кДНК библиотеке). У оквиру одељка „Испитивање биолошке активности на хуманим ћелијама“, најпре су детаљно описане детаљно основне методе рада са хуманим ћелијским линијама, односно чување, гајење, пресејавање и бројање. Након тога, следећи одељци се односе на методе одређивања цитотоксичности путем МТТ теста, као и детаљну методологију свих корака алкалног комет теста за испитивање генотоксичности. Следи опис метода за испитивање промене у количини супероксидног аниона у ћелијама применом NBT теста, промене у активности ензима каталазе у ћелијама, промена у морфологији ћелија. У наставку, описани су и кораци теста

акутне токсичности на индикаторском организму *Artemia salina*, и најзад, процедура примењена за облагање скафолда од биостакла.

На крају потпоглавља „Методе“ налази се сегмент „Статистичка обрада података“ у коме су побројани програми и тестови за статистичку анализу добијених резултата, и описани начини представљања резултата.

Поглавље „Резултати“ састоји се из четири потпоглавља: „Синтеза и карактеризација“, „Биохемијска активност“, „Биолошка активност“ и „Облагање скафолда од биостакла са композитом и компонентама“. Прво од потпоглавља, „Синтеза и карактеризација“, бави се синтезом ResNPs. ResNPs су синтетисане физичкохемијском методом растварач-нерастварач, једноставном и приступачном, и која не подразумева употребу токсичних и скувих хемикалија и полимерних носача. За праћење промена у њиховој морфологији током варирања параметара процесовања коришћен је оптички микроскоп. Показано је да брзина и време хомогенизације не утичу значајно на морфологију честица, односно њихов облик налик нано-тракама, дужине  $\sim 17 \mu\text{m}$  и ширине  $\sim 750 \text{ nm}$ . Затим су приказане морфолошке особине честица ResSeNPs композита добијених варирањем услова њихове синтезе, а које су обухватале употребу ресвератрола, ResNPs или аскорбинске киселине као редукционог средства у синтези SeNPs, као и хомогенизацију већ припремљених суспензија ResNPs и SeNPs. На основу анализе морфолошких особина на оптичком микроскопу, последњи начин синтезе, односно хомогенизација готових суспензија појединачних компоненти, је одабран за примену у даљем раду, будући да је овај метод резултовао у материјалу у коме су обе врсте честица биле присутне у неизмењеној форми. Истакнута је и чињеница да примењени метод представља једноставан приступ који не захтева додатну опрему нити хемикалије, што је такође допринело избору методе синтезе композита за даља истраживања. На микрографијама са оптичког микроскопа уочавају се издужене, униформне структуре дужине око  $17 \mu\text{m}$ , односно ResNPs, као и агломерати наночестица селена асоциране са њима. Морфологија композита, али и компоненти, прецизније је утврђена снимањем на FESEM уређају. Утврђена је просечна ширина ResNPs, која је  $750 \text{ nm}$ , као и присуство наночестица селена сферног облика, пречника испод  $100 \text{ nm}$ . На микрографијама ResSeNPs, могу се уочити појединачне наночестице селена, униформно распоређене по тракама ResNPs.



Мерење рН вредности и UV-Vis спектроскопија су употребљени како би се проценила стабилност композита и компоненти. UV-Vis спектроскопија је показала одсуство промена у спектру ResNPs након синтезе у односу на комерцијални ресвератрол. Што се тиче ResSeNPs композита, у спектру суспензије одмах након синтезе присутни су пикови карактеристични за компоненте, док након шест месеци складиштења долази до губитка пика пореклом од суспензије SeNPs. Ова појава указује на деградацију неке од компоненти SeNPs, или даље реакције SeNPs и ResNPs у композиту током времена. Резултати испитивања асоцијације SeNPs са ResNPs сугеришу да је око 60 % наночестица селена остало асоцирано са ResNPs у композиту током првих 24 часа инкубације на 37° C. FTIR спектроскопија је потврдила неизмењену форму ресвератрола након синтезе ResNPs, као и то да је вероватно дошло до формирања водоничних веза између ResNPs и SeNPs у композиту. Испитивања техникама DSC и XRD су показала разлике у кристалној структури између ResNPs и комерцијалног ресвератрола.

У потпоглављу „Биохемијска активност“ приказани су резултати тестова на антиоксидативну активност, DPPH, FRAP и TBA, у којима је показана висока антиоксидативна активност композита (преко 80% неутрализије DPPH слободног радикала на свим тестираним концентрацијама композита) која се остварује путем више механизма, као и изражена синергија компоненти, нарочито што се тиче редукције јона гвожђа и инхибиције липидне пероксидације. Док је SeNPs компонента показала бољу способност неутрализације слободних радикала у DPPH тесту и редуковања јона гвожђа у FRAP тесту, ResNPs су се боље показале у TBA тесту, што је указало на њихову способност инхибиције липидне пероксидације.

Потпоглавље „Биолошка активност“ је представљено из два дела. У првом, под називом „Антимикробна активност“, приказани су резултати који доказују значајан директан ефекат композита ResSeNPs на грам-позитивне сојеве, али значајно слабију активност према грам-негативним сојевима. Поређењем са ефектима појединачних компоненти, констатује се да је главни носилац антибактеријске активности композита SeNPs компонента. Иако ResNPs саме по себи немају висок антимикробни потенцијал, тестирање композита је указало на извесну синергију обе компоненте у погледу антибактеријске активности. Испитивање антибиофилм ефекта путем CV теста на *S. aureus*, *S. epidermidis* и *P. aeruginosa* је показало израженији антибиофилм ефекат него директно антимикробно дејство, нарочито што се

тиче ResNPs компоненте. Такође, потврђена је висока активност SeNPs, што је уз синергију са ResNPs довело до значајне антибиофилм активности композита. Испитивање експресије одабраних гена укључених у формирање биофилма код *P. aeruginosa*, тачније *algD* и *pelA* гена, показало је да механизам антибиофилм дејства композита и компоненти није остварен преко утицаја на ове гене. Други део из потпоглавља „Биолошка активност“ се бави испитивањем биокомпатибилности композита и компоненти. МТТ тест за испитивање цитотоксичности примењен је на хуманим ћелијским линијама нормалних фибробласта фетуса (MRC-5), аденокарцинома плућа (A549), хепатоцелуларног карцинома (HepG2) и колоректалног канцера (HCT 116 и HT-29). Добијени резултати су показали да су композит и његове компоненте нетоксични у концентрацијама потребним за постизање антиоксидативног и антибиофилм ефекта, иако су цитотоксични у већим концентрацијама. На ћелијској линији нормалних фибробласта, композит је био мање токсичан од збира дејстава компоненти (уочен је антагонизам), што није био случај код већине канцерских линија. Морфолошке промене, примећене применом оптичке микроскопије ћелија фиксираних након третмана, су међутим биле уочљиве и на нетоксичним концентрацијама, и то и на нормалним и на канцерским ћелијама. Комет тест је дао увид у генотоксични потенцијал – утврђено је да код већине ћелијских линија (осим код HepG2, при већим концентрацијама), композит ResSeNPs није испољио генотоксичну активност, иако је SeNPs компонента имала умерени генотоксични ефекат на свим линијама.

Мерењем нивоа супероксидног аниона и активности ензима каталазе испитани су ефекти композита и компоненти на маркере и ензиме везане за оксидативни стрес. Ови маркери су веома варирали код нормалних и канцерских ћелија, што указује да је ефекат ResSeNPs и појединачних компоненти зависан од биологије одабраних ћелијских линија, а у случају композита још и од могућих интеракција компоненти.

Осим на хуманим ћелијама, токсичност је испитана и *in vivo*, на моделу *Artemia salina*, а резултати су потврдили високу биоактивност и сличан опсег нетоксичних концентрација који је добијен и путем МТТ теста. У последњем потпоглављу „Резултата“, описани су резултати облагања скафолда од биостакла употребом ResSeNPs композита, добијени употребом FTIR спектроскопије и оптичке микроскопије. Ове анализе су показале да је ResNPs компонента, захваљујући одговарајућем облику и величини честица ресвератрола, била одговорна за одличне резултате облагања композитом.

У поглављу „Дискусија“, аутор детаљно објашњава добијене резултате, поредећи их са резултатима описаним у литаратури и стављајући их у контекст са проблемима и досадашњим решењима у сличним областима истраживања. На почетку поглавља, објашњен је значај овог истраживања. Истакнути су основни захтеви за побољшање дизајна биоматеријала, као и савремени проблеми везани за ширење резистенције на антибиотику, који заједно условљавају развој нових материјала у смеру антибактеријског и антиоксидативног ефекта и њихове мултифункционалности. Затим, објашњени су основни разлози за одабир ресвератрола и селена као агенаса у овом истраживању, потреба за анализом појединачних компоненти у композиту, као и тежња за једноставном и практичном методом његове синтезе.

Међу експерименталним резултатима, прво су анализирани они који се односе на компоненту ResNPs. Метод синтезе и карактеристике добијених честица упоређени су са литературним подацима који се тичу различитих метода синтезе наночестица ресвератрола, и истакнуте су предности честица добијених током ове докторске дисертације методом растварач-нерастварач, без додатних компоненти. Такође, облик нано-трака је описан уз примере сличних материјала и бенефите оваквог облика у ткивном инжењерству. Након тога, укратко су продискутовани резултати добијени различитим методама који потврђују стабилност ResNPs у односу на комерцијални ресвератрол.

Даље, дискутован је одабир најпогодније методе синтезе композита на бази ResNPs и SeNPs а затим и морфолошке особине добијеног композита. На основу претходних истраживања, објашњено је да су повољна биокомпатибилност и антимикуробни ефекат били разлози за одабир SeNPs, односно методе њихове синтезе. Физичкохемијска карактеризација и стабилност анализирани су уз позивање на релевантне литературне податке.

Како је ResSeNPs композит показао високу антиоксидативну активност, следећи део текста у оквиру поглавља „Дискусија“ бавио се детаљном анализом добијених резултата, уз навођење да је главни носилац антиоксидативног ефекта у случају директне инхибиције слободних радикала и редукције јона гвожђа била компонента SeNPs, док су у случају инхибиције липидне пероксидације то биле ResNPs. Уз помоћ података из литературе, такође је продискутован и феномен синергије ове две компоненте у композиту, што се тиче антиоксидативног ефекта.

Посебна пажња је затим посвећена анализи резултата тестирања антимикуробног потенцијала. Уз широк преглед литературе, дискутовани су различити налази о антимикуробном дејству ресвератрола, уз поређење са овде добијеним резултатима, а такође су разматрани могући механизми дејства. Дат је такође и преглед литературе која се тиче антимикуробног потенцијала наночестица селена, након чега је продискутована примећена синергија компоненти у ResSeNPs композиту. Синергија је нарочито уочљива у смислу антибиофилм ефекта, чему је посвећен следећи одељак „Дискусије“, док резултати анализе експресије гена укључених у формирање биофилма нису омогућили коначне закључке. Најзад, продискутовани су могући механизми антибиофилм ефекта ResSeNPs композита. Што се тиче биокомпатибилности, прво су анализирани резултати тестирања цитотоксичности, уз поређење са доступном литературом везаном за ресвератрол, селен и њихове нано-форме. Упоредијене су разлике у цитотоксичности на више хуманих ћелијских линија, канцерских и нормалних, пореклом из различитих ткива. Истакнут је феномен смањене токсичности ResSeNPs композита на линији нормалних ћелија, у односу на збир дејстава компоненти (антагонизам), што није био случај код већине канцерских линија. Резултати тестирања генотоксичног потенцијала, и мерења маркера оксидативног стреса су детаљно анализирани уз литературне податке, како би се продискутовали могући механизми дејства ResNPs, SeNPs и ResSeNPs композита на наследни материјал. Након тога, дискутовани су резултати испитивања токсичности *in vivo* на *Artemia salina*, који потврђују високу биоактивност и сличан опсег нетоксичних концентрација као у МТТ тесту.

Најзад, анализиран је резултат успешног облагања скафолда од биостакла композитом ResSeNPs, применом методе упаравања, уз констатацију да је употреба ове методе омогућила успешно облагање, чему су значајно допринели одговарајући облик и величина наночестица ресвератрола.

У поглављу „Закључци“, кандидаткиња наводи 13 конкретних закључака који су проистекли из резултата истраживања током ове докторске дисертације. Крајњи закључак, имајући у виду све наведено, јесте да је ResSeNPs композит показао добре физичкохемијске карактеристике потребне за облагање скафолда од биостакла, одлични антиоксидативни и антимикуробни потенцијал и прихватљиву биокомпатибилност, тј. одсуство цито-, гено- и *in vivo* токсичности у биолошки активним концентрацијама, те се у складу са тиме може

сматрати добрим кандидатом за даља истраживања, а у циљу потенцијалне примене у области ткивног инжењерства.

У оквиру поглавља „Литература“ наведене су 202 библиографске јединице. Библиографски извори су обухватили одговарајућа новија истраживања у релевантним областима, обезбеђујући добру потпору истраживању изнетом у оквиру ове докторске дисертације, те квалитетну дискусију могућих механизма који леже у основи уочених феномена.

Последње, осмо поглавље, „Прилози“, садржи приказе морфологије ResNPs након сушења у различитим условима, резултате DPPH теста са аскорбинском киселином, резултате тестирања цитотоксичности прекурсора за SeNPs, односно натријум селенита, додатне микрографије нормалних MRC-5 ћелија третираних ResSeNPs композитом, као и снимке скафолда добијене под поларизованим светлом.

### **Радови и конгресна саопштења проистекли из докторске дисертације:**

#### **Б1. Радови у часописима међународног значаја**

1. **Tomić, N., Matic, T., Filipović, N., Mitić Ćulafić, D., Boccaccini, A. R., & Stevanović, M. M. (2023).** Synthesis and characterization of innovative resveratrol nanobelt-like particles and assessment of their bioactivity, antioxidative and antibacterial properties. *Journal of Biomaterials Applications*, 38(1), 122–133. **M22 (IF=2,3)**  
<https://doi.org/10.1177/08853282231183109>
2. **Tomić, N., Stevanović, M. M., Filipović, N., Ganić, T., Nikolić, B., Gajić, I., & Ćulafić, D. M. (2024).** Resveratrol/Selenium Nanocomposite with Antioxidative and Antibacterial Properties. *Nanomaterials*, 14(4), 368. **M21 (IF=4,4)**  
<https://doi.org/10.3390/nano14040368>

#### **Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу (M34)**

1. **Tomić, N., Kuzmanović, M., Mitić Ćulafić, D., & Stevanović, M. (2021).** Additive-free resveratrol micro- and nanoparticles and assessment of their toxicity. Program and the

Book of Abstracts / Nineteenth Young Researchers' Conference Materials Science and Engineering, December 1-3, 2021, Belgrade, Serbia. Belgrade: Institute of Technical Sciences of SASA.

<https://dais.sanu.ac.rs/handle/123456789/12283;jsessionid=C3E4ACD3E30B359BBB8D02B287176EF2>

2. **Tomić, N.**, Filipović, N., Mitić Čulafić, D., & Stevanović, M. (2022). Synthesis and characterization of composite resveratrol/selenium nanomaterial, and preliminary assessment of its' antioxidative effect and biocompatibility. Programme and the Book of Abstracts / Twentieth Young Researchers' Conference Materials Science and Engineering, November 30 - December 2, 2022, Belgrade, Serbia. Belgrade: Institute of Technical Sciences of SASA. <https://dais.sanu.ac.rs/handle/123456789/13501>
3. **Tomić, N.**, Filipović, N., Mitić Čulafić, D., Ganić, T., Klyagin, S., Osmolovskiy, A., & Stevanović, M. (2023). Activity of resveratrol nanobelt-like particles against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Program and the Book of Abstracts / Twenty-First Young Researchers' Conference Materials Science and Engineering, November 29 – December 1, 2023, Belgrade, Serbia. Belgrade: Institute of Technical Sciences of SASA. <https://dais.sanu.ac.rs/handle/123456789/15635>
4. **Tomić, N.**, Filipović, N., Mitić Čulafić, D., & Stevanović, M. (2023). Antioxidative Resveratrol Particles as a Bioactive Component for Material Design. 28. Mednarodna Konferenca O Materialih in Tehnologijah = 28th International Conference on Materials and Technology. Ljubljana: Inštitut za kovinske materiale in tehnologije. <https://dais.sanu.ac.rs/handle/123456789/15749>
5. **Tomić, N.**, Stevanović, M., Filipović, N., & Mitić Čulafić, D. (2023). Cytotoxic and genotoxic potential of composite based on resveratrol and selenium nanoparticles, and its potential for superoxide anion induction. 13th International Congress of the Serbian Society of Toxicology & 1st toxSEE Regional Conference: Present and Future of Toxicology: Challenges and Opportunities: 10-12 May 2023 Belgrade: Abstract Book. Beograd: Udruženje toksikologa Srbije. <https://dais.sanu.ac.rs/handle/123456789/16245>
6. **Tomić, N.**, Mitić-Čulafić, D., Filipović, N., Ganić, T., Kuzmanović, M., & Stevanović, M. (2024). Composite based on resveratrol and selenium as an antioxidative component in

tissue engineering: Abstract. Hemijska Industrija, 78(1S (2024): Supplementary Issue - ExcellMater Conference 2024), 16–16. <https://dais.sanu.ac.rs/handle/123456789/16561>

7. **Tomić, N.**, Stevanović, M., Nikolić, B., Ganić, T., Filipović, N., Kornienko, E., Osmolovskiy, A., & Mitić-Ćulafić, D. (2024). Antimicrobial potential of resveratrol nanobelt-like particles. From Biotechnology to Human and Planetary Health [Elektronski Vir]: XIII Congress of Microbiologists of Serbia - Mikromed Regio 5: Mona Plaza Hotel Belgrade, Serbia - 4th-6th of April, 2024: Book of Abstracts. Belgrade: Serbian Society for Microbiology. <https://dais.sanu.ac.rs/handle/123456789/16719>
8. **Tomić, N.**, Stevanović, M., Filipović, H., Ganić, T., Kuzmanović, M., Cvetković, C., Nikolić, B., Lukač, C., Vuletić, S., Mitić Ćulafić, D., Testing of cytotoxic, genotoxic, and ROS- inducing effects of nanocomposite material based on resveratrol and selenium nanoparticles, VII congress of the Serbian Genetic Society, Zlatibor, October 2 to 5, 2024.

## Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиња Нине М. Томић, број индекса Б3014/2018, послата је 05.11.2024. на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио истог дана. На основу извештаја који је добијен анализом докторске дисертације Нине М. Томић, под насловом „**Композитни материјал базиран на наночестицама ресвератрола и селена: синтеза, карактеризација и биолошка активност**“, коришћењем програма iThenticate, добијен је индекс сличности који износи 6%. Увидом у извештај утврђено је да је добијен степен подударности последица пре свега претходно публикованих резултата докторандових истраживања, проистеклих из ове дисертације. Уз то, индекс подударности допринели су и неки општи подаци, као што су латинска имена микроорганизама, скраћенице, библиографски подаци о коришћеној литератури, као и широко коришћени појмови у списку материјала и опису метода. Поједини делови текста који показују подударност нису повезани са тематиком докторске дисертације и немају смисао.

Када се све изнето узме у обзир, а у складу са чланом 8., став 2, Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Нине М. Томић, под насловом „**Композитни материјал базиран на наночестицама ресвератрола и селена: синтеза, карактеризација и биолошка активност**“, те се прописани поступак за њену одбрану може наставити.

### **Мишљење и предлог Комисије**

Докторска дисертација Нине М. Томић представља оригинални научно-истраживачки рад који се бави синтезом и карактеризацијом, те биохемијским и биолошким активностима композита на бази ресвератрола и селена, као и његових компоненти, са циљем потенцијалне употребе у ткивном инжењерству. Овде је први пут описана синтеза композитног материјала састављеног из наночестица ресвератрола и селена. Међу добијеним резултатима су и први извештаји о синергистичкој антимикуробној и антибиофилм активности ресвератрола и селена, примењених у комбинацији у саставу композита. Такође, резултати испитивања цитотоксичности, генотоксичности и ефеката на оксидативни стрес у ћелијама доприносе разумевању могућих нежељених ефеката примене наноматеријала у хуманим ћелијама, а тестирање *in vivo* токсичности додатно помаже правилној процени степена њихове биокомпатибилности. Дисертација се одликује јасно дефинисаним циљевима, адекватним одабиром метода за њихово постизање, успешно реализованим експериментима са изразитим мултидисциплинарним карактером, квалитетном дискусијом и концизно изведеним закључцима. Остварени резултати објављени су у оквирима два оригинална међународна научна рада, од којих је један штампан у часопису који се налази у првих 30% са SCI листе, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата. Имајући у виду експериментални рад, остварене резултате и написану докторску дисертацију, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени, тако да позитивно оцењује докторску дисертацију. Имајући све горе наведено у виду, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у



Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидата **Нине М. Томић**, под насловом „**Композитни материјал базиран на наночестицама ресвератрола и селена: синтеза, карактеризација и биолошка активност**“ и омогући кандидату јавну одбрану рада.

**КОМИСИЈА:**

У Београду, 07. 11. 2024. године

---

др Биљана Николић, редовни професор,  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

---

др Славиша Станковић, редовни професор,  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

---

др Ненад Филиповић, виши научни сарадник  
Институт техничких наука САНУ

---

др Ина Гајић, ванредни професор,  
Универзитет у Београду – Медицински факултет

---

др Маја Кузмановић, научни сарадник,  
Институт техничких наука САНУ