

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ
Наставно-научном већу

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата мастер физикохемичара Ненада Филиповића

Одлуком Наставно-научног већа Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду, са IX редовне седнице одржане 14. јуна 2018. године (број одлуке 772), именовани смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата мастер физикохемичара Ненада Филиповића, под насловом: **Синтеза и карактеризација биокомпозита поли (ε-капролактон) / наночестице селена.**

Израда докторске дисертације под наведеним насловом одобрена је одлуком Наставно-научног већа Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду са X редовне седнице, одржане 12 јула 2016. године (број одлуке 890). На основу те одлуке, Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на својој седници одржаној 15. септембра 2016. године прихватило предложену тему докторске дисертације (број одлуке 61206-4300/2-16). На основу прегледа и анализе докторске дисертације подносимо Већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Основни подаци о кандидату и дисертацији

Ненад Филиповић је рођен 25.11.1984. године у Нишу, држава Србија. Основне студије је уписао школске 2003/04. године на Факултету за физичку хемију Универзитета у Београду и завршио их са просечном оценом 8.23 и дипломским радом "Термичка стабилност и кристализација аморфне легуре $\text{Fe}_{89.8}\text{Ni}_{1.5}\text{Si}_{5.2}\text{B}_3\text{C}_{0.5}$ ". Мастер рад под насловом "Механизам првог

кристалizacionог ступња аморфне легуре $\text{Fe}_{89.8}\text{Ni}_{1.5}\text{Si}_{5.2}\text{B}_3\text{C}_{0.5}$ " је одбранио 2011. године на истом факултету. Исте године је уписао докторске студије, на Факултету за физичку хемију Универзитета у Београду. У Институту техничких наука САНУ је запослен од новембра 2011. године. Ангажован је на пројекту интегралних и интердисциплинарних истраживања ИИИ 45004, "Молекуларно дизајнирање наночестица контролисаних морфолошких и физикохемијских карактеристика и функционалних материјала на њиховој основи".

Докторска дисертација мастер физикохемичара Ненада Филиповића написана је на 173 стране, а у складу са Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду. После *Резимеа* на српском и енглеском језику (6 страна), *Захвалнице* (1 страна) и *Садржаја* (5 страна), следи главни део дисертације који се састоји од следећих целина: *Увод* (22 стране), *Циљ истраживања* (2 стране), *Експериментални део* (41 страна), *Резултати и дискусија* (88 страна), *Закључак* (4 стране), *Литература* – 223 навода (16 страна), после чега следе *Прилог* (4 стране) и *Биографија и билиографија* (5 страна). Дисертација садржи укупно 74 слике и 8 табела.

У делу *Резиме* на српском и енглеском језику, дат је кратак опис целокупне дисертације уз навођење најважнијих резултата.

У поглављу *Општи део* описани су најважнији појмови, достигнућа и тренутно стање у научним областима којима истраживања, обухваћена овом докторском дисертацијом, припадају. Посебан акценат је стављен на област контролисане доставе активних компонената и материјале коришћене за дизајнирање новог система који је тема саме дисертације тј. честица биокомпозита поли (ϵ -капролактон)/наночестице селена.

У делу *Циљ истраживања* наведени су главни циљеви истраживања и методе које су коришћене за реализацију тих циљева.

Поглавље *Експериментални део* садржи два дела: (1) опис експерименталних техника које су коришћене и (2) опис метода синтезе и испитивања утицаја параметара синтезе на одређена својства честица поли (ϵ -

капролактона) (PCL-a), наночестица Ce (SeNp) и честица биокомпозита поли (ϵ -капролактон)/наночестице селена (PCL/SeNp).

У делу *Резултати и дискусија* приказани су резултати свих испитивања наведених у експерименталном делу уз адекватно тумачење добијених резултата, као и њихово поређење са литературним подацима добијеним за сличне системе. На крају овог дела, на основу свих резултата добијених детаљним физичкохемијским карактеризацијама, дефинисана је потенцијална примена биокомпозита PCL/SeNp.

У поглављу *Закључак* сумирани су најважнији резултати и закључци који су проистекли из истраживања у оквиру ове дисертације.

Б. Приказ садржаја дисертације

Ова докторска дисертација представља мултидисциплинарно истраживање у области физичке хемије материјала, а чији је главни циљ био да се утврде оптимални услови за синтезу иновативног биокомпозита сачињеног од микросфера поли (ϵ -капролактона) (PCL-a) у које су инкорпориране наночестице селена (SeNp). На основу детаљне карактеризације коришћењем различитих метода физичкохемијске анализе као и одређених биолошких испитивања, дефинисана су сва својства од значаја за потенцијалну примену овог биокомпозита. Сам процес добијања биокомпозита PCL/SeNp извршен је кроз три фазе.

У првој фази су утврђени оптимални услови синтезе при којима се физичкохемијском методом растварач/нерастварач могу добити униформне сферне честице PCL-a, просечног пречника око 500 nm, када се као стабилизатор користи полиглутаминска киселина (PGA). Применом лиофилизације као методе сушења, величина честица је редукована на <200 nm при концентрацији раствора PGA од 0,05%. Биокомпатибилност PCL честица је испитана у *in vitro* условима и резултати су показали да честице не испољавају штетан ефекат на НерG2 ћелијској линији.

У оквиру друге фазе испитан је утицај разних параметара на синтезу аморфних наночестица селена (SeNp) као и њихова антибактеријска и антиканцерогена активност. Параметри који су се показали као најоптималнији при редукција натријум селенита (Na_2SeO_3) аскорбинском киселином су: (1) употреба албумина говеђег серума (BSA) као стабилизатора и (2) молски однос прекурсора и редукционог средства 1:5. Као резултат добијене су сферне, аморфне наночестице селена величине испод 80 nm. Испитивање антибактеријске активности узорака показало је значајну ефикасност колоидног раствора SeNp у инхибицији Грам-позитивних сојева *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) и *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), главних узрочника инфекција у ортопедији. Што се тиче антиканцерогене активности показано је да концентрација колоидног раствора SeNp од 3,75% након 48 часова готово у потпуности уништава HeLa ћелије које су коришћене као модел у овим испитивањима.

У завршној фази је синтетисан биокомпозит PCL/SeNp уз дефинисање оптималних параметара при којима се колоидни раствор SeNp може ефикасно инкорпорирати унутар сферних честица PCL-а. Величина добијених микросфера PCL/SeNp је 1-3 μm , а ефикасност инкорпорирања SeNp је износила 92%. Деградација добијеног биокомпозита је испитана у 4 деградациона медијума: (1) пуфер фосфатних соли (PBS), (2) раствор липазе изоловане из панкреаса свиње у PBS-у, (3) 0.1 М хлороводонична киселина (HCl), и (4) суспензија ћелијског екстракта изолованог из бактеријског соја *P. aeruginosa* PA01 у PBS-у. Показано је да у периоду од 660 дана овај биокомпозитни систем веома споро отпушта SeNp у медијумима са физиолошким pH, док у киселом медијуму није забележено присуство SeNp. Са дуге стране у бактеријском екстракту је забележено појачано отпуштање већ после првог дана, а након 7 дана је достигнута максимална вредност од 29,2% од укупне количине инкорпорираниог селена. На крају је испитана биокомпатибилност микросфера PCL/SeNp на HepG2 ћелијама и добијени резултати су потврдили да је овај биокомпозит биокомпатибилан. На основу добијених резултата закључено је да биокомпозит PCL/SeNp има изузетан

потенцијал као материјал за облагање импланта са циљем спречавања појаве инфекције и формирања биофилма, услед ослабљеног имунитета пацијената који су подвргнути хируршким захватима имплантирања.

Експерименталне технике којима су вршене физичкохемијске карактеризације узорака су: инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR), раманска спектроскопија, дифракција рендгенског зрачења (XRD), скенирајућа, трансмисиона и високорезолуциона трансмисиона електронска микроскопија (SEM, TEM и HRTEM), метода одређивања расподеле величина честица (PSD), метода мерења зета потенцијала, термогравиметријска и диференцијална термијска анализа (TGA-DTA), диференцијална сканирајућа калориметрија (DSC), атомска емисиона спектроскопија са индуктивно спрегнутом плазмом (ICP-AES). За биолошка испитивања коришћене су микродилуциона метода за одређивање антимикуробне активности, колориметријски тест за одређивање ћелијске метаболичке активности (МТТ тест), 2',7' – дихлорофлуоресцеин диацетат (DCFDA) тест за одређивање настанка реактивних врста кисеоника (ROS) и комет тест за одређивање потенцијалне генотоксичности.

Ц. Упоредна анализа резултата дисертације са резултатима из литературе

Наночестице селена (SeNp) представљају нову форму овог микроелемента која се у последње време интензивно испитује у погледу антиканцерогеног, антибактеријског, антивирусног дејства, итд. (Fernandes, A. P. & Gandin, V., *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 1850 (2015) 1642–1660; Maiyo, F. & Singh, M. *Nanomedicine*, 12 (2017) 1075–1089; Sakr, T. M., Korany, M. & Katti, K. V., *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 46 (2018) 223–233). Разлог великог интересовања за овим обликом селена лежи у томе што је у бројним студијама доказано да је доста ефикаснији од осталих хемијских облика селена у погледу разних биолошких активности, а уз то испољава смањени токсични ефекат (Wang, H., Zhang, J. & Yu, H., *Free Radic. Biol. Med.* 42 (2007) 1524–1533; Zhang, J., Wang, H., Bao, Y. & Zhang, L., *Life Sci.* 75 (2004) 237–244; Zhang, J., Wang, X. & Xu, T.

T., *Toxicol. Sci.* 101 (2008) 22–31). До сада је у литератури пријављено много метода за синтезу наночестица селена – SeNp. Оне се генерално могу поделити у три групе: (1) методе хемијске синтезе (хемијска редукција), (2) методе физичке синтезе (ласерска аблација, микроталасно зрачење) и (3) методе биосинтезе (редукција уз помоћ биолошких организама или њихових екстракта) (Sarkar, B. *et al. Nanoscale Res. Lett.* 10 (2015) 371-384; Chhabria, S. & Desai, K., *Encycl. Nanosci. Nanotechnol.* (2016) 1–32). У овој дисертацији као метода синтезе аморфних SeNp коришћена је редукција натријум селенита аскорбинском киселином, уз употребу албумина говеђег серума (BSA) као стабилизатора где се као крајњи продукт добија колоидни раствор SeNp. Методе хемијске синтезе-редукције су и даље најзаступљенији приступ за добијање SeNp због њихове једноставности, репродуцибилности, доброг реакционог приноса и могућности да се површина SeNp "декорише" разним једињењима која им омогућавају специфичну примену. Поред аскорбинске киселине као редукциона средства могу се користити глукоза, натријум тиосулфат, глутатион итд. а као стабилизатор, поред BSA коришћени су разни полисахариди (хитозан, карбоксиметил целулоза, натријум алгинат), аминокиселине, поливинил алкохол (PVA) итд. (Zhang, J. S., Gao, X. Y., Zhang, L. D. & Bao, Y. P., *Biofactors* 15 (2001) 27–38; Zhang, S. Y., Zhang, J., Wang, H. Y. & Chen, H. Y., *Mater. Lett.* 58 (2004) 2590–2594; Shah, C., Kumar, M. & Bajaj, P. *Nanotechnology* 18 (2007) 385607). Оно што се може истаћи као важан резултат ове дисертације који до сада није пријављен у поменутиим радовима, јесте да је кључни параметар у добијању стабилног колоидног раствора SeNp молски однос редукционог средства и прекурсора. Наночестице селена које су синтетисане у оквиру овог докторског рада су показале знатну бактеријску активност према два од шест испитаних сојева: *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*. Ови сојеви се сматрају најчешћим узрочницима болничких инфекција. Минималне инхибиторне концентрације колоидног раствора SeNp које су довеле до престанка развоја бактерија су 125 и 250 µg/ml респективно. У поређењу са литературним подацима, резултат добијен за *Staphylococcus aureus* је у складу са истраживањима које су спровели D.M.

Cruz и сарадници као и G. Guisbiers и сарадници (Cruz, D. M., Mi, G. & Webster, T. J., *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 106 (2018) 1400–1412; Guisbiers, G. et al., *Int. J. Nanomedicine*, 11 (2016) 3731–6). У првом наведеном истраживању се ради о SeNp које су синтетисане методом биосинтезе, док су у другом истраживању коришћене наночестице селена синтетисане ласерском аблацијом. Међутим аутори у оба рада наводе и значајнији антибактеријски ефекат према соју *Escherichia coli* што није случај са резултатима ове дисертације. Ово неслагање је објашњено разликом у површинској хемији самих честица тј. могућношћу да BSA фаворизује интеракцију са Грам-позитивним бактеријама. Селективни антибактеријски ефекат SeNp према Грам-позитивним сојевима је пријављен и у истраживању P. Tran-а и сарадника са наночестицама селена истих димензија али синтетисаних уз додатак PVA као стабилизатора (Tran, P. A. et al., *Nanotechnology* 27 (2015) 045101). Испитивања антиканцерогеног ефекта SeNp на HeLa ћелијама су показала да концентрација колоидног раствора SeNp од 3,75% или 23,6 µg/ml чистог селена је довољна да уништи готово све ћелије након 48 сати. У поређењу са истраживањем Huang-а и осталих сарадника који су при истим експерименталним условима добили резултат од 50 µg/ml за наночестице синтетисане без употребе стабилизатора, може се закључити да употреба BSA за стабилизацију SeNp поспешује антиканцерогени ефекат (Huang, G., Zhang, Y., Zhang, Q., Zhang, B. & Wen, L., *Sci. China Chem.* 53 (2010), 2272–2278). У другом раду објављеном од стране L. Kong-а и осталих аутора SeNp стабилисане молекулима BSA су инхибирале раст ћелија карцинома простате, а при концентрацији од 100 µM су довеле до смањења вијабилности ћелија од преко 60% након 48 сати инкубирања (Kong, L. et al., *Biomaterials* 32 (2011) 6515–6522).

Ризик од потенцијалног токсичног ефекта је и даље главни проблем који лимитира примену SeNp у биомедицинске сврхе. Токсичност наночестица селена може бити условљена величином, морфологијом као и природом стабилизатора који се користе за њихово добијање. Због тога је често тешко извести закључке о концентрацијама које би биле у потпуности одговарајуће за примену у терапијске сврхе. Главна идеја којом су мотивисана истраживања

овог докторског рада је била да се инкорпорирањем наночестица селена у биокомпатибилни полимерни носач – PCL који би у физиолошким условима ове честице отпуштао јако споро, умањио ризик од потенцијалног токсичног ефекта SeNp. Са друге стране, у одређеним патолошким ситуацијама, као што су то бактеријске инфекције, отпуштање би било знатно брже и SeNp би могле да испоље терапијски ефекат на локацији инфекције.

Биодеградабилни и биокомпатибилни полимери припадају групи материјала која је у последњих двадесетак година у средишту бројних истраживања која се тичу биомедицинске примене (Stevanović M., Chapter 11, In: *Nanostructures for Drug Delivery*. Elsevier (2017) 355–78; Francis R, Sakthi Kumar D. *Biomedical Applications of Polymeric Materials and Composites*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. (2016)). Ова истраживања највећим делом потичу из области контролисане доставе активних компоненти и ткивног инжењерства. PCL је добро познат биодеградабилни полимер кога одликују добра биокомпатибилност (одобрен је од стране Америчке агенције за контролу хране и лекова-FDA), дуго време деградације, висока пермеабилност према многим молекулима, изостанак деградационих производа који снижавају pH, одличне механичке карактеристике, способност да се лако меша са осталим материјалима итд. (Cama G., Mogosanu D.E., Houben A. & Dubruel P., In: *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers: Materials and Properties*, Elsevier (2016) 79–105). Како је један од првих синтетисаних биодеградабилних полимера, PCL је један од најчешће коришћених и испитаних материјала из области контролисане доставе и ткивног инжењерства (Woodruff, M. A. & Hutmacher, D. W., *Prog. Polym. Sci.* 35 (2010) 1217–1256; Dash, T. K. & Konkimalla, V. B., *J. Control. Release*, 158 (2012) 15–33). Што се тиче система за контролисану доставу до сада је у овај полимер инкапсулирано мноштво разноврсних медикамената али је потенцијал за развијањем нових система практично неограничен. Као носачи активних супстанци најчешће се примењују микро- и наносфере. До сада је пријављено мноштво метода за синтезу PCL микро- и наносфера и ту пре свега спадају емулзионе методе, метода измене растварача, метода распршивања

полимерног раствора у ситне капљице и њихово сушење, таложење полимера на граници фаза, дијализа помоћу одговарајућих мембрана итд. (Rao, J. P. & Geckeler, K. E. *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 887–913; Sinha, V. R. *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* 278 (2004) 1–23). Притом, свака од ових синтеза захтева употребу одговарајућег стабилизатора. Најчешће коришћени стабилизатори за синтезу микро- и наночестица PCL-а су: поливинил пиролидон (PVP), поливинил алкохол (PVA), спан 20, полусорбате 80, Pluronic F 127, натријум додецил сулфат (SDS) итд. Међутим без обзира на велики број радова на ову тему сваки нови систем PCL микро/наносфера са новом активном компонентом носи неке новине и разлике у погледу стабилности, интеракције и отпуштања те компоненте. Да би се оне утврдиле потребне су детаљне карактеризације ових система разним физичкохемијским методама анализе. У овом докторском раду први пут је пријављен систем микросферних честица PCL-а у које су инкорпорирани наночестице селена (SeNp). За синтезу биокompatibilita PCL/SeNp коришћена је метода растварач/нерастварач која у основи представља методу измене растварача. Такође у самом процесу синтезе као стабилизатор по први пут је пријављена употреба полиглутаминске киселине (PGA). Још један од резултата који је овде добијен а који се може сматрати као новина у микросферним системима за контролисану доставу на бази PCL-а јесте тај да је профил отпуштања наночестица селена условљен њиховом површинском хемијом (присуство BSA) и расподелом унутар PCL микросфера. Поред тога, у овој дисертацији је први пут примењен бактеријски екстракт за успешно катализовање деградационих процеса PCL-а. У ту сврху, до сада су се најчешће користиле липазе изоловане из одређених бактеријских сојева.

Д. Научни радови и саопштења у којима су публиковани резултати из докторске дисертације

Рад у међународном часопису изузетних вредности (M21a):

1. N. Filipović, M. Stevanović, A. Radulović, V. Pavlović, D. Uskoković, ***Facile synthesis of poly(epsilon-caprolactone) micro and nanospheres using different types of polyelectrolytes as stabilizers under ambient and elevated temperature***, Composites Part B: Engineering, 45 (2013) 1471–1479.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesb.2012.07.008>

Рад у врхунском међународном часопису (M21):

1. N. Filipović, M. Stevanović, J. Nunić, S. Cundrić, M. Filipič, D. Uskoković ***Synthesis of poly(epsilon-caprolactone) nanospheres in the presence of the protective agent poly(glutamic acid) and their cytotoxicity, genotoxicity and ability to induce oxidative stress in HepG2 cells***, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 117 (2014) 414–24.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.015>.
2. Magdalena Stevanović, Nenad Filipović, Jelena Djurdjević, Miodrag Lukić, Marina Milenković, Aldo Boccaccini, ***4S5 Bioglass®-based scaffolds coated with selenium nanoparticles or with poly(lactide-co-glycolide)/selenium particles: Processing, evaluation and antibacterial activity***, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 132 (2015) 208-215.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.024>.

На основу изложеног, комисија закључује да резултати кандидата мастер физикохемичара Ненада Филиповића приказани у оквиру ове докторске дисертације представљају оригиналан и значајан научни допринос у области физичке хемије, посебно у домену физичке хемије материјала. Резултати у оквиру ове докторске дисертације ће допринети проширењу знања из области примене полимера поли(ε-капролактона) као материјала за контролисану доставу лекова, као и на пољу добијања и примене наночестица селена. Делови дисертације су публиковани у једном међународном часопису изузетних вредности (M21a) и у виду два рада у

врхунским међународним научним часописима (M21), као и кроз 11 саопштења на међународним научним скуповима штампаних у изводу и једног штампаног у целини.

Сходно наведеном, комисија позитивно оцењује докторску дисертацију мастер физикохемичара Ненада Филиповића под насловом **“Синтеза и карактеризација биокompозита поли (ϵ -капролактон) / наночестице селена”** и предлаже Наставно-научном већу Факултета за физичку хемију да прихвати ову оцену комисије и одобри јавну одбрану дисертације, чиме би били испуњени сви услови да кандидат стекне звање доктор физичкохемијских наука.

Чланови комисије:

др Магдалена Стевановић, научни саветник
Институт техничких наука САНУ

Проф. др Милош Мојовић, ванредни професор
Универзитет у Београду-Факултет за физичку хемију

Проф. др Марина Миленковић, редовни професор
Универзитет у Београду-Фармацеутски факултет

Проф. др Гордана Ђирић-Марјановић, редовни професор
Универзитет у Београду-Факултет за физичку хемију

У Београду
06. август 2018.