

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА - УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IX редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета - Универзитета у Београду, одржаној 13.07.2021. године, на основу молбе ментора, др Ане Подолски-Ренић, вишег научног сарадника на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду и др Сање Дацић, доцента на Биолошком факултету Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Мирне Н. Јовановић, истраживача сарадника на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду, под насловом: „Развој антитуморске стратегије применом инхибиције тиоредоксин-редуктазе 1 у ћелијским моделима глиобластома и неуробластома“, у саставу: др Милица Пешић, научни саветник на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду, др Данијела Лакета, доцент на Биолошком факултету Универзитета у Београду, др Миодраг Драгој, научни сарадник на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Мирне Н. Јовановић под насловом „Развој антитуморске стратегије применом инхибиције тиоредоксин-редуктазе 1 у ћелијским моделима глиобластома и неуробластома ” урађена је на Одељењу за неуробиологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду, уз финансијску подршку Министарства за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије (кандидат је истраживач сарадник на институционалном пројекту евиденциони бр. 451-03-9/2021-14/200007) и ERA.Net RUS+ пројекта „THIOREDIN – Development of thioredoxin reductase inhibitors towards new anti-cancer agents“ (RUS_ST2017-309).

Докторска дисертација садржи 104 стране. Пагинирани текст докторске дисертације чине следећа поглавља: Увод (26 страна), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (19 страна), Резултати (35 страна), Дискусија (8 страна), Закључци (1 страна) и

Литература (14 страна). Дисертација садржи 43 слике (12 у поглављу Увод, 2 у поглављу Материјал и методе и 29 у поглављу Резултати) и 10 табела (5 у поглављу Материјал и методе и 5 у поглављу Резултати). У поглављу Литература су цитиране 273 библиографске јединице. Дисертација садржи и уобичајене уводне (непагиниране) стране са неопходним информацијама о докторској дисертацији: Сажетке на српском и енглеском језику, Информације о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Садржај, као и Листу скраћеница. На крају дисертације су приложена следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

У поглављу **Увод**, кандидаткиња Мирна Н. Јовановић, кроз седам целина даје сажет преглед података из научне литературе који се односе на проблематику докторске дисертације. У првом делу кандидаткиња нас упознаје са општим карактеристикама тумора, као и са процесима који леже у основи туморигенезе. Истакнута особина измењених, туморских ћелија је измењен метаболизам, прилагођен убрзаном расту и пролиферацији. Последица метаболичке активности туморских ћелија је и повећана производња реактивних хемијских врста. Повећана концентрација реактивних хемијских врста доводи до ћелијске смрти, те је преживљавање туморских ћелија омогућено повећаном активношћу и експресијом антиоксидативних ензима, који неутралишу слободне радикале. У следећој целини описани су тумори централног нервног система, са посебним освртом на глиоме и стратегије у њиховом лечењу. Описан је „Ступов протокол“, златни стандард у терапији глиома, а потом и механизам деловања хемиотерапеутика темозоломида. Даље су описани неуробластоми, развојни екстракранијални тумори нервног система, са највећом учесталошћу код деце, као и приступи у лечењу неуробластома. Истакнута је ограниченост доступних терапијских стратегија код глиома и неуробластома, поред чије примене смртни исход је чест, а у случају примарних глиобластома представља неминовност. Како је у фокусу ове докторске дисертације и резистенција на хемиотерапију, део **Увода** описује ћелијске механизме резистенције на цитостатике. Издваја се улога повећане експресије мембранских транспортера – P-gp, BCRP и MRP1 у одговору на примену хемиотерапеутика. Описани су основни механизми стицања резистенције на једина два хемиотерапеутика одобрена у лечењу глиома, кармустина и темозоломида. Затим су описане реактивне кисеоничне и азотне врсте, које настају у ћелијама, као резултат метаболичке активности или утицаја спољашњих фактора, као и антиоксидативни системи, одговорни за уклањање реактивних врста и успостављање хомеостатског стања унутар ћелије. Истакнуто је да су ASK1/JNK и ASK1/p38 MAP кључни сигнални путеви који су под утицајем реактивних хемијских врста, те да је експресија већине антиоксидативних ензима регулисана Nrf2/Keap1 протеинским системом. Потом је истакнута улога коју оксидативни стрес има у

различитим фазама настанка и прогресије туморских ћелија и на који начин се манипулацију оксидативним стресом примењује у стратегијама за спречавање раста тумора. Како је ова докторска дисертација заснована на хипотези да инхибиција важног антиоксидативног система у ћелији – тиоредоксинског система, може да се примени у лечењу тумора, у наредном потпоглављу су детаљно описани редокс системи ћелије, тиоредоксински и глутатионски систем, а посебна пажња је посвећена структурним и функционалним особинама ензима тиоредоксин-редуктазе 1 (TR1). У последњој целини **Увода** представљени су инхибитори тиоредоксинског система – терапеутици који су у клиничкој примени или у фазама клиничког испитивања. Посебно су истакнуте новосинтетисана једињења, Уги-Мајклови акцептори (УМА), кандидати за терапеутике са инхибиторним ефектом на TR1, чије дејство на ћелије глиома, неуробластома и нормалних хуманих ћелија је испитано у оквиру ове дисертације. У оквиру ове дисертације испитане су инхибиторне особине и антитуморско дејство 6 Уги-Мајклових акцептора (УМА) прве серије (DVD једињења), као и 7 аналога DVD-445 друге серије синтезе. Сва једињења су добијена у сарадњи са истраживачком групом Михаила Красавина, из Лабораторије за хемијску фармакологију Хемијског института Универзитета у Санкт Петербургу у оквиру ERA.Net RUS+ пројекта „THIOREDIN – Development of thioredoxin reductase inhibitors towards new anti-cancer agents“ (RUS_ST2017-309).

У поглављу **Циљеви** дефинисано је пет основних научних циљева:

1. окарактерисати УМА као инхибиторе тиоредоксинског система.
2. окарактерисати ћелијске моделе за испитивање ефекта УМА, у погледу експресије TR 1 и тиоредоксина, на нивоу иРНК, као и ниво протеина TR1 у ћелијским линијама глиобластома, неуробластома и нормалним хуманим кератиноцима.
3. испитати антитуморска својства УМА на моделима глиобластома и неуробластома, при чему су дефинисани подциљеви: а) упоредити цитотоксични ефекат УМА на ћелијским моделима хуманих глиобластома, неуробластома и нормалним ћелијама (кератиноцима и хуманим моноклеарним ћелијама из периферне крви) и б) испитати утицај УМА на повећање унутарћелијског садржаја реактивних кисеоничних и азотних врста, као и индукцију ћелијске смрти.
4. испитати механизам антитуморског дејства најпотентнијих УМА на сензитивним и вишеструко резистентним ћелијама глиома пацова и хуманих ћелија глиобластома, са следећим подциљевима: а) испитати ефекат УМА на инхибицију ћелијског раста, б) утврдити утицај УМА на оксидативни стрес и експресију антиоксидативних ензима, в) испитати ефекат УМА у повећању осетљивости на антиглиомски терапеутик темозоломид, г) утврдити врсту

интеракције УМА са Р-гр, д) испитати утицај УМА на ћелијску миграцију и инвазију.

5. испитати да ли новосинтетисани аналози водећег УМА једињења из прве серије имају побољшана инхибиторна и антитуморска својства.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** кандидаткиња је детаљно описала све фазе експерименталног рада. У почетном делу описане су хумане туморске линије сензитивних и резистентних ћелија глиома (U87, U87-TxR), хуманих кератиноцита (HaCaT), хуманих фибробласта плућа (MRC5) и пацовских сензитивних и резистентних ћелија глиома (C6, RC6), а описана је и индукција резистенције код хуманих и пацовских ћелија резистентног фенотипа. Дати су начини и услови гајења ћелија. Затим је описана изолација периферних моноклеарних ћелија из хумане крви здравих добровољних давалаца. Описани су колориметријски тестови за испитивање активности TP, засновани на редукцији обојеног супстрата – Елмановог реагенса (ДТНБ). Примењена су три типа теста: а) у првом је испитана активност TP у протеинском лизату ћелија, при чему је описан начин изолације протеина за потребе теста; б) у другом је испитана активност пречишћеног, рекомбинантног ензима TP1; в) у трећем тесту је испитана активност целокупног тиоредоксинског система - TP1 и тиоредоксина 1, са редукованим супстратом тиоредоксина – инсулином као крајњим индикатором активности тиоредоксинског система. Потом је описан МТТ тест, коришћен за одређивање инхибиторног ефекта УМА једињења и хемиотерапеутика на ћелијски раст, а описани су детаљно и појединачни и комбиновани третмани примењивани на различитим ћелијским моделима. Представљена је методологија примене проточне цитофлуориметрије за испитивање количине реактивних кисеоничних и азотних врста, при чему је за детекцију супероскид анјона употребљена флуоресцентна боја дихидрородамин, а за детекцију пероксинитрата и водоник-пероксида - флуоресцентна боја дихидрородамин. Детаљно су описане процедуре изолације иРНК-а и протеина, као и методе квантитативног PCR-а и „Western blot“-а коришћене за анализу нивоа експресије испитиваних гена и протеина. Потом, описана је метода колориметријске детекције редукованог глутатиона у ћелијским лизатима. Применом проточне цитофлуориметрије испитиван је и ефекат третмана на експресију протеина ASK1, RNR и TP1, промена митохондријалног мембранског потенцијала, индукција ћелијске смрти, пролиферација ћелија и акумулацију родамина. За испитивање инвазивног и миграторног потенцијала ћелија коришћени су тест разлагања желатина и тест инвазије. У завршном делу овог поглавља описане су одговарајуће статистичке методе коришћене за обраду добијених резултата.

У поглављу **Резултати** кандидаткиња је дала детаљан приказ резултата добијених током спроведених истраживања уз одговарајуће табеларне и илустративне приказе и пратеће статистичке анализе. Представљени су резултати инхибиторног ефекта УМА једињења на: TP1 у ћелијском лизату, изолованом протеину TP1 и целокупни

тиоредоксински систем. Ови резултати су послужили за избор најактивнијих TP1 инхибитора за даља механистичка испитивања. Потом, представљена је упоредна анализа експресије иРНК TP1 и тиоредоксина 1, као и протеина TP1, у хуманим ћелијама глиома, неуробластома и кератиноцитима, која је дала основу за тумачење инхибиторног дејства испитиваних једињења на поменутих ћелијама. Следи анализа ефекта 6 УМА једињења и позитивне контроле пиперлонгумина на инхибицију раста ћелија U87, SH-SY5Y, HaCaT и хумане ћелије крви где је утврђено да ова једињења имају значајну селективност ка туморским и активно пролиферишућим ћелијама. Затим је представљен и ефекат УМА једињења на индукцију оксидативног стреса у наведеним ћелијским линијама и резултати анализе индукције ћелијске смрти ћелија SH-SY5Y и HaCaT који су додатно потврдили селективно дејство ка туморским ћелијама. У следећем одељку, представљен је механизам дејства два једињења, DVD-444 и DVD-445, на сензитивне и вишеструко резистентне ћелије глиома. Приказани резултати показују да DVD-444 и DVD-445 имају значајан инхибиторни ефекат на ћелијски раст, повећавају оксидативни стрес, мењају концентрацију редукованог глутатиона, као и експресију иРНК антиоксидативних ензима (тиоредоксина 1, TP1, глутатион-пероксидазе 1, глутатион-пероксидазе 4, глутатион-редуктазе, глутатион-С-трансферазе пи, манган супероксид-дисмутаза и каталаза), експресију протеина ASK1, RNR и TP1, доводе до деполаризације митохондрија, индукују ћелијску смрт, заустављају пролиферацију ћелија хуманих глиобластома као и миграцију и инвазију сензитивних и резистентних и хуманих, и пацовских ћелија глиома. У наредном одељку приказано је повећање осетљивости хуманих и пацовских ћелија глиома на хемиотерапеутике, темозоломид и паклитаксел, у комбинованом третману са DVD-444 и DVD-445. Показано је и да ова два једињења могу инхибирати активност P-гр пумпе. У последњој целини **Резултата** приказани су инхибиторни ефекти серије аналога DVD-445 на ензим TP1, а потом и на ћелијски раст сензитивних и резистентних хуманих ћелија глиобластома, као и ћелија фибробласта плућа, при чему је истакнут селективни потенцијал једињења ка туморским ћелијама у односу на нормалне хумане ћелије. Приказан је ефекат на индукцију оксидативног стреса у сензитивним и резистентним хуманим ћелијама глиобластома, као и потенцијал за инхибирање активности P-гр пумпе у резистентним ћелијама хуманих глиобластома.

У оквиру поглавља **Дискусија**, кандидаткиња је дала критички осврт на резултате своје докторске дисертације користећи литературне податке из 273 наведене референце. У првом делу овог поглавља кандидаткиња је дискутовала УМА потенцијал инхибиције TP1 и предложила механизам инхибиције на основу очекиваних хемијских интеракција између TP1 ензима и малих, електрофилних једињења, попут Мајклових акцептора. Истакла је да УМА делују пре свега на редуковани ензим TP1, а у складу са тиме, УМА су селективно инхибирале раст пролиферишућих ћелија, где је количина редукованог ензима већа услед већег редокс потенцијала. Кандидаткиња је потом коментарисала и већу селективност поменутих инхибитора ка туморским ћелијама у односу на нормалне ћелије, у погледу

индукције оксидативног стреса и ћелијске смрти. Дискутован је механизам антитиморског дејства УМА једињења DVD-444, и DVD-445. Поред антитуморских ефеката у појединачним третманима једињењима DVD-444 и DVD-445, коментарисан је и њихов синергистички ефекат са хемиотерапеутицима темозоломидом и паклитакселом у сензитивним и резистентним ћелијама глиома, као и ефекат супресије активности P-гр пумпе. Потом, дискутоване су унапређене особине аналогних једињења DVD-445, у погледу веће селективности ка туморским ћелијама и снажнијим прооксидативним ефектом, при чему је пожељне особине у највећој мери испољило једињење 9. На крају, кандидаткиња је анализирала акутну и дуготрајну интеракцију аналога са P-гр, код којих је једињење 20 показало конзистентан ефекат инхибиције P-гр пумпе у оба случаја.

У поглављу **Закључак**, кандидаткиња је изнела концизне закључке који су проистекли из резултата истраживања:

1. Испитана УМА једињења прве серије су специфични инхибитори TP1 и тиоредоксинског система, при чему је као најпотентнији инхибитор издвојена DVD-445.
2. УМА селективно инхибирају раст пролиферишућих ћелија и снажно индукују оксидативни стрес у ћелијама неуробластома, са селективном индукцијом некрозе у туморским ћелијама у односу на нормалне хумане кератиноците.
3. DVD-444 и DVD-445 мењају експресију антиоксидативних ензима у сензитивним и резистентним ћелијама глиома пацова и човека, доводе до деполаризације мембранског потенцијала митохондрија и узрокују ћелијску смрт глиома пацова, као и инхибицију пролиферације хуманих ћелија, а поред тога значајно смањују способност миграције и инвазије туморских ћелија.
4. Истовремени третман једињењима DVD-444 или DVD-445 и темозоломидом има синергистички ефекат и повећава осетљивост ћелија глиома на овај хемиотерапеутик, а поред тога ова два УМА једињења инхибирају P-гр пумпу и доводе до реверзије резистенције на паклитаксел код хуманих ћелија глиобластома, резистентних на паклитаксел.
5. Аналози DVD-445 једињења снажније инхибирају TP1 и у већој мери индукују оксидативни стрес, имају већу селективност ка туморским ћелијама у односу на DVD-445 и имају особине модулатора P-гр активности.

Завршно поглавље **Литература**, садржи листу од 273 коришћене библиографске јединице, од којих је велики број најновијег датума. Референце су адекватно наведене, покривају све аспекте истраживања и на одговарајућим местима су цитиране у тексту ове докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Jovanović M, Zhukovsky D, Podolski-Renić A, Domračeva I, Žalubovskis R, Senčanski M, Glišić S, Sharoyko V, Tennikova T, Dar'in D, Pešić M, Krassavin M. (2019) Novel electrophilic amides amenable by the Ugi reaction perturb thioredoxin system via thioredoxin reductase 1 (TrxR1) inhibition: Identification of DVD-445 as a new lead compound for anticancer therapy. Eur J Med Chem. 181:111580, (IF= 5.573, M21a), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111580>.
2. Jovanović M, Zhukovsky D, Podolski-Renić A, Žalubovskis R, Dar'in D, Sharoyko V, Tennikova T, Pešić M, Krasavin M. (2020) Further exploration of DVD-445 as a lead thioredoxin reductase (TrxR) inhibitor for cancer therapy: optimization of potency and evaluation of anticancer potential. Eur J Med Chem, 112119, (IF=6.514, M21a), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112119>.
3. Jovanović M, Dragoj M, Zhukovsky D, Dar'in D, Krasavin M, Pešić M, Podolski-Renić A. (2020) Novel TrxR1 Inhibitors Show Potential for Glioma Treatment by Suppressing the Invasion and Sensitizing Glioma Cells to Chemotherapy. Front Mol Biosci, 7:586146, (IF= 5.246, M21), <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.586146/full>.

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Jovanović M, Podolski-Renić A, Zhukovsky D, Stepanović M, Dragoj M, Stanković T, Dinić J, Zalubovkis R, Krasavin M, Pešić M. Development of TrxR1 inhibitors yielded six new Ugi-Michael acceptors with anticancer effects in neuroblastoma cells, 22nd International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants – Paris Redox, June 2019, Paris, France – poster presentation, abstracts book p102, (M34).
2. Jovanović M, Podolski-Renić A, Dragoj M, Stanković T, Dinić J, Zalubovkis R, Krasavin M, Pešić M. Novel TrxR1 inhibitors induce cell death by oxidative stress and sensitize rat glioma cells to temozolomide, The 41st EORTC-PAMM Winter Meeting, February 2020, Stockholm, Sweden – poster presentation, abstracts book p49, (M34).
3. Jovanović M, Dragoj M, Jovanović Stojanov S, Kostić A, Dinić J, Nešović M, Pešić M, Podolski-Renić A. Novel anti-cancer compound – inhibitor of TrxR1 distress GSH system in glioma cells, SFRR-E 2021, June 2021, Belgrade, Serbia – poster presentation, abstracts book p134, (M34).

Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Развој антитуморске стратегије применом инхибиције тиоредоксин-редукзе 1 у ћелијским моделима глиобластома и неуробластома“, кандидата Мирне Н. Јовановић, утврђено је свеукупно подударање текста од 24%. Овај степен подударности је кумулативан и условљен преклапањем општих места и података (попут елемената садржаја, листе скраћеница, назива институција, обавезних прилога докторској дисертацији), општих научних термина, стандардних лабораторијских протокола, претходно публикованих резултата докторандових истраживања који су проистекли из ове дисертације што је у складу са чланом 9. Правилника.

Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију, као и објављене научне радове Мирне Н. Јовановић, Комисија са задовољством може истаћи да приказани резултати дају значајан научни допринос у области разумевања могуће примене инхибитора тиоредоксин-редуктазе 1 у терапији глиобластома и неуробластома, као и да отварају нове могућности за унапређење постојећих терапеутских приступа у лечењу ових тешких обољења.

Стога, имајући у виду актуелност истраживачке проблематике и значај постигнутих резултата, као и целокупну научну активност кандидата, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију и предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри Мирни Н. Јовановић јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Развој антитуморске стратегије применом инхибиције тиоредоксин-редуктазе 1 у ћелијским моделима глиобластома и неуробластома”.

КОМИСИЈА:

У Београду, 14.07.2021. године

др Милица Пешић, научни саветник,
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ –
Институт од националног значаја за Републику Србију,
Универзитет у Београду

др Данијела Лакета, доцент,
Биолошки факултет,
Универзитет у Београду

др Миодраг Драгој, научни сарадник,
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ –
Институт од националног значаја за Републику Србију,
Универзитет у Београду