

NASTAVNOM-NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 17.11.2022. godine, broj 11/X-4/4-, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Interakcija mitogenom aktiviranih protein kinaza i autofagije u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage forbol-12-miristat-13-acetatom“**

kandidata Miloša Mandića, zaposlenog na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor je profesor dr Vladimir Trajković, a komentor naučni saradnik dr Maja Misirkić Marjanović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Doc. dr Vladimir Perović, docent, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Darko Ćirić, docent, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. N. Sar. dr Biljana Ristić, naučni saradnik, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. V. N. Sar. dr Ljubica Vučićević, viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Silvana Andrić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije**

Doktorska disertacija Miloša Mandića napisana je na ukupno 86 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 1 tabela i 36 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** su opisane osnovne karakteristike akutne mijeloidne leukemije (AML), navedena je klasifikacija, učestalost AML u populaciji, mehanizam nastanka bolesti kao i mutacije i translokacije koje dovode do nastanka bolesti. Opisana je diferencijaciona terapija koja ima za cilj da aktivira diferencijaciju tumorskih ćelija. Pomenuti su različiti agensi koji indukuju diferencijaciju, navedena su novija istraživanja u oblasti diferencijacione terapije AML, kao i prednosti i nedostaci ove terapije. Potom je objašnjen i prikazan detaljan mehanizam aktivacije protein kinaze C (PKC) sa posebnim osvrtom na aktivator PKC, forbol 12-miristat 13-acetat (PMA), koji indukuje diferencijaciju leukemijskih ćelija u makrofage. U uvodu je potom definisana autofagija, tipovi autofagije i mehanizam indukcije autofagije u okviru kojeg su pomenuti najvažniji autofagni molekuli. Pored mTORC1 (engl. *mechanistic target of rapamycin complex 1*) koji učestvuje u aktivaciji autofagije, navedeni su i transkripcioni faktori koji regulišu ekspresiju autofagnih gena. U skladu sa rezultatima novijih istraživanja, navedeni su primeri u kojima autofagija učestvuje u diferencijaciji hematopoetskih i leukemijskih ćelija. Potom su opisane MAPK (mitogenom aktivirane protein kinaze) sa posebnom osvrtom na ERK (engl. *extracellular signal-regulated-kinase*) i JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*), njihov način aktivacije i ulogu u diferencijaciji leukemijskih ćelija. Zatim je detaljno objašnjena uloga ERK i JNK u indukciji autofagije u različitim eksperimentalnim modelima.

**Ciljevi rada** su precizno definisani i podrazumevaju ispitivanje uloge autofagije i MAP kinaza u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage pod dejstvom PMA, kao i uloge AMPK, mTOR i MAPK signalnih puteva u indukciji autofagije u pomenutom modelu diferencijacije.

U poglavlju „**Materijal i metode**“ opisani su rastvori, reagensi i metode koje su korišćene u istraživanju. Opisana je kultivacija humane leukemijske ćelijske linije HL-60 koja je korišćena u svim eksperimentima. Za ispitivanje markera diferencijacije, parametara ćelijske smrti, autofagije i produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) korišćena je protočna citofluorimetrija. Potom je detaljno objašnjena priprema za reakciju lančanog umnožavanja posle reverzne transkripcije sa detekcijom proizvoda u realnom vremenu (RT-qPCR) koja je korišćena za određivanje nivoa iRNK gena od interesa. Za ispitivanje morfologije ćelija korišćene su fazno-kontrastna i konfokalna mikroskopija. Za ispitivanje ekspresije i aktivacije proteina korišćena je imunoblot analiza. Za izolaciju citosolne i jedarne frakcije upotrebljen je komercijalni kit, dok je metodom ko-imunoprecipitacije ispitivano prisustvo proteinskih interakcija. Za utišavanje ekspresije gena od interesa korišćena je RNK interferencija, pri

čemu su ćelije transfektovane elektroporacijom odgovarajućim siRNK (engl. *small interfering RNA*). U statističkoj analizi nezavisnih ili parnih uzoraka korišćen je Studentov t-test ( $n \geq 3$ ). Ova studija je odobrena od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

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

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, rezultati doktorske disertacije su analizirani u odnosu na rezultate drugih istraživanja.

**Zaključci** su proistekli iz rezultata rada i odgovorili su na zadate ciljeve istraživanja.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 361 reference.

## **B) Provera originalnosti doktorske disertacije**

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Interakcija mitogenom aktiviranih protein kinaza i autofagije u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage forbol-12-miristat-13-acetatom”, autora Miloša Mandića, utvrđeno je da podudaranje teksta iznosi 14%.

Najveći deo podudarnosti pronađen je u poglavlju 3 („Materijali i metode”), gde je program iThenticate kao tačke podudarnosti prepoznao nazive većine upotrebljenih hemikalija i reagenasa, njihove proizvođače, navedene koncentracije i razblaženja. Prepoznati su i nazivi samih metoda (i u Sadržaju i u samim podnaslovima), kao i veći deo uputstava za sprovođenje eksperimentalnih metoda, pri čemu ni jedna rečenica nije prepoznata kao misaona celina koja je identična nekom drugom sadržaju. Ostatak podudarnosti se odnosio na korišćenje opšteprihvaćenih i široko korišćenih reči i fraza u opisivanju pojava koje se pominju u disertaciji, kao i pominjanje određenih ličnih imena, imena institucija, i sl. Pored toga, u svim ostalim poglavljima disertacije, osim nužnih podudaranja pomenutih opštih mesta, nisu nađene podudarnosti sa navedenim tvrdnjama ili misaonim celinama. Verujemo da ne bi bilo moguće značajno smanjiti procenat podudarnosti bez izostavljanja ključnih podataka o materijalima i metodama koje su korišćene u izradi ove disertacije.

S druge strane, u poglavljima 1 („Uvod”), 2 („Ciljevi”), 4 („Rezultati”), 5 („Diskusija”) i 6 („Zaključci”), nađena je podudarnost prevashodno u pojedinačnim rečima i često korišćenim frazama koje se tiču pojava koje se obrađuju u disertaciji kao što su puni i skraćeni nazivi

molekula. Napominjemo da nijedna misaona celina, niti pojedinačna tvrdnja, izneta u poglavljima 4 („Rezultati”), 5 („Diskusija”) i 6 („Zaključci”), gde se apsolutno zahteva originalnost i autentičnost u doprinosu naučno-istraživačkom radu, nije pokazala podudarnost sa do sada objavljenim radovima, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija.

### **C) Kratak opis postignutih rezultata**

Za ispitivanje doze PMA koja indukuje diferencijaciju HL-60 ćelija bez citotoksičnog efekta, korišćena je metoda bojenja ćelija sa aneksin V-FITC-om i propidijum jodidom. Na osnovu dobijenih rezultata izabrana je doza od 50 nM koja je korišćena u daljim eksperimentima. PMA je indukovala diferencijaciju HL-60 ćelija u makrofage, što je pokazano morfološkim promenama kao što su formiranje citoplazmatskih nastavaka, grupisanje ćelija u klustere i adhezija ćelija za podlogu. Analizom protočne citofluorimetrije utvrđeno je da je PMA indukovala zastoj ćelijskog ciklusa i povećanu ekspresiju makrofagnih markera CD11b, CD13, CD14 i CD45. Metodom RT-qPCR pokazano je da je PMA povećala i transkripciju makrofagnih gena *EGRI*, *CSF1R* i *IL-8*.

Indukcija autofagije u diferencijaciji HL-60 ćelija sa PMA je utvrđena korišćenjem različitih metoda za detekciju autofagije. Imunoblot analiza je pokazala da je tretman HL-60 ćelija sa PMA povećao nivo LC3-II, ATG7 i p62 i stimulisao autofagni fluks. Korišćenjem fluorescentnog mikroskopa na HL-60 ćelijama obojenim akridin oranž bojom, nakon tretmana sa PMA uočeni su autofagolizozomi kao narandžasto-crvene kisele vezikule. Pokazano je i da je PMA povećala transkripciju autofagnih gena (*ULK-1*, *FIP200*, *FOXO1*, *FOXO3*, *TFEB*, *BIF-1*, *VPS34*, *ATG7* i *p62*). Korišćenjem ko-immunoprecipitacije i imunoblota utvrđeno je da je PMA aktivirala autofagiju i oslobađanjem beklina-1 iz kompleksa sa Bcl-2. Autofagija je aktivirana izlaskom autofagnog represora ZKSCAN3 iz jedra i ulaskom aktivatora autofagije FOXO1, FOXO3 i TFEB u jedro HL-60 ćelija.

Imunoblot analiza je pokazala da PMA inhibira AMPK i aktivira Akt/mTORC1 što ukazuje na indukciju autofagije nezavisno od AMPK i mTORC1. Rezultati su pokazali da je PMA aktivirala PKC i MAP kinaze, ERK i JNK. Farmakološka inhibicija ERK i JNK je smanjila nivo LC3-II i p62. Inhibicija PKC je smanjila fosforilaciju ERK i JNK, nivo LC3-II i p62, što pokazuje da je PMA indukovala ERK/JNK-zavisnu autofagiju aktivacijom PKC u HL-60 leukemijskim ćelijama. Utišavanjem ekspresije uzvodne kinaze za ERK (MKK1) ili uzvodne kinaze za JNK (MKK7) dovelo je do smanjenja autofagnog fluksa, nivoa p62 i transkripcije

autofagnih gena. Pokazano je da je utišavanje ekspresije gena za MKK7 efikasnije od utišavanja ekspresije gena za MKK1 u inhibiciji transkripcije autofagnih gena. Ovi rezultati su ukazali na to da ERK i JNK aktiviraju transkripciju autofagnih gena u kojoj JNK ima dominantnu ulogu. ERK i JNK su stimulisali transkripciju autofagnih gena u HL-60 ćelijama tretiranim sa PMA premeštanjem aktivirajućih transkripcionih faktora autofagije u jedro. Imunoblot analiza citosolne i jedarne frakcije je pokazala da su ERK i JNK zajedno uključeni u transport TFEB iz citoplazme u jedro, dok samo JNK promoviše ulazak FOXO1 i FOXO3 u jedro HL-60 ćelija tretiranih sa PMA. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da ERK i JNK aktiviraju autofagiju i na posttranslacionom nivou razdvajanjem beklina-1 od Bcl-2. Mehanizam kojim je JNK uticala na disocijaciju ovog kompleksa je fosforilacija Bcl-2 na serinu 70.

Da ERK i JNK učestvuju u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA pokazano je farmakološkom i genskom inhibicijom ERK i JNK, koja je smanjila ekspresiju makrofagnih markera CD11b, CD45 kao i transkripciju *EGR1*, *CSF1R* i *IL-8* makrofagnih gena. Kako je utvrđeno da PKC aktivira ERK i JNK i da ove MAP kinaze učestvuju u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA pokazano je i da je aktivacija PKC neophodna u diferencijaciji. Analiza ekspresije markera diferencijacije CD11b i CD45 protočnom citofluorimetrijom je pokazala smanjenje njihove ekspresije pod dejstvom inhibitora PKC bisindolilmalemida I. Kako je pokazano da PMA indukuje autofagiju u HL-60 ćelijama, za ispitivanje uloge autofagije u diferencijaciji korišćena je njena farmakološka inhibicija upotrebom bafilomicina A1 i utišavanjem ekspresije gena za ATG5 i p62 RNK interferencijom. Inhibicija autofagije je smanjila ekspresiju makrofagnih markera (CD11b, CD45, EGR1, CSF1R i IL-8). Ovi rezultati su pokazali da autofagija učestvuje u diferencijaciji HL-60 ćelija u makrofage pod dejstvom PMA.

PMA je dovela do povećane produkcije RKV u HL-60 ćelijama što je pokazano na osnovu povećanja intenziteta fluorescencije dihalorfluoresceina u odnosu na kontrolu na protočnom citofluorimetru. Primenom antioksidanta N-acetil cisteina (NAC) je smanjena ekspresija markera makrofaga CD11b, na osnovu čega je zaključeno da RKV učestvuju u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA. RKV delimično učestvuju u indukciji autofagije u HL-60 ćelijama tretiranim sa PMA jer je imunoblot analiza pokazala da NAC smanjuje fosforilaciju ERK i nivo LC3-II, dok je slabiji uticaj pokazao na fosforilaciju JNK i nije uticao na promenu u nivou p62.

## **D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

U ovoj studiji je pokazano da autofagija koju aktiviraju ERK i JNK učestvuje u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage pod dejstvom PMA, aktivatora PKC. PMA je indukovala autofagiju i to je utvrđeno povećanjem: unutarćelijskog zakišeljavanja, tačkaste distribucije i lipidacije LC3 i transkripcije autofagnih gena. Transkripciona aktivacija autofagije je u skladu sa prethodnom studijom u kojoj je transkripcija autofagnih gena povećana nakon četiri dana diferencijacije HL-60 ćelija tretiranih sa PMA (Welch i sar., 2017). Rezultati ove disertacije su pokazali da je PMA povećala nivo p62, što može da označava inhibiciju autofagije jer se p62 tokom autofagije razgrađuje u autolizozomima. Utvrđeno je da je nivo p62 povećan zbog aktivirane transkripcije gena za p62, što je u skladu sa rezultatima drugih studija u kojima je povećan nivo p62 značajan u selektivnoj autofagiji (Lamark i sar., 2017). Takođe, poznato je da se u granulocitnoj diferencijaciji leukemijskih ćelija sa retinoičnom kiselinom (ATRA) aktivira autofagija, zajedno sa povećanim nivoom p62 (Trocoli i sar., 2014).

Prethodne studije su pokazale da autofagija učestvuje u diferencijaciji hematopoetskih i leukemijskih ćelija (Riffelmacher i sar., 2017, Wang i sar., 2011). Rezultati ovog istraživanja su utvrdili da se utišavanjem ekspresije gena za ATG5 i p62 smanjuje nivo LC3-II i ekspresija makrofagnih markera, što ukazuje da autofagija zavisna od ATG5 i p62 učestvuje u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA. U ovom modelu diferencijacije, uloga autofagije je dodatno potvrđena korišćenjem bafilomicina, farmakološkog inhibitora autofagije.

Autofagija se u većini eksperimentalnih modela aktivira kada je suprimiran mTORC1 i aktivirana AMPK (Rabanal-Ruiz i sar., 2017). Rezultati ove disertacije su pokazali da PMA inhibira AMPK i aktivira mTORC1 zbog čega je indukcija autofagije nezavisna od AMPK i mTORC1. Ovi rezultati su u skladu sa podacima prethodnih studija u kojima je PMA aktivirala mTORC1 na različitim ćelijskim linijama (Zogovic i sar., 2015, Leontieva i sar., 2014, Ribeiro i sar., 2018) i inibirala AMPK u THP-1 ćelijskoj liniji humane monocitne leukemije (Vasamsetti i sar., 2015). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je inhibicija PKC sprečila indukciju autofagije inhibicijom ERK i JNK, što je u skladu sa podacima da MAPK aktivirane pomoću PKC učestvuju u indukciji autofagije (Zhang i sar., 2009, Chen i sar., 2008).

U ovoj disertaciji je pokazano da ERK i JNK stimulišu transkripciju autofagnih gena u HL-60 ćelijama tretiranim sa PMA premeštanjem aktivirajućih transkripcionih faktora autofagije (TFEB, FOXO1 i FOXO3) u jedro. Liu i saradnici su pokazali da JNK dovodi do odvajanja TFEB od 14-3-3 $\delta$ , sa kojim je u inhibitornoj interakciji u citosolu, što bi mogao da bude mehanizam za njegov ulazak u jedro u ovom modelu diferencijacije (Liu i sar., 2019). U ovoj disertaciji, ERK je takođe uticao na translokaciju TFEB u jedro što nije u skladu sa rezultatima studije u kojoj ERK sprečava njegov ulazak u jedro (Settembre i sar., 2011). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je aktivacija PKC inaktivirala GSK3 $\beta$ , čime je poništena inhibitorna fosforilacija na TFEB pod uticajem GSK3 $\beta$  (Li i sar., 2016), što je omogućilo transport TFEB u jedro. Poznato je da ERK indirektno učestvuje u inaktivaciji GSK3 $\beta$  (Ding i sar., 2005), što su rezultati ove disertacije pokazali jer se inhibicijom ERK smanjuje fosforilacija GSK3 $\beta$ , čime se objašnjava uloga ERK u premeštanju TFEB u jedro. Uloga TFEB u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA je u skladu sa rezultatima prethodne studije u kojoj je TFEB neophodan u indukciji autofagije i diferencijaciji ćelija promijelocitne leukemije sa ATRA (Orfali i sar., 2020). Pored aktivacije TFEB, JNK stimuliše transport FOXO1 i FOXO3 u jedro što je u skladu sa studijom u kojoj je pokazano da JNK fosforiliše FOXO3 što omogućava njegovo premeštanje u jedro i povećanu transkripcionu aktivnost (Tikhanovich i sar., 2014). Takođe, poznato je da JNK aktivira FOXO1/3 indirektno tako što utiče na disocijaciju FOXO1/3 od 14-3-3 adapterskih proteina (Tzivion i sar., 2011, Weng i sar., 2016).

Pored transkripcione aktivacije autofagije, PMA indukuje autofagiju na posttranslacionom nivou tako što dovodi do disocijacije beklina-1 od Bcl-2 koja je zavisna od ERK i JNK. Ovi rezultati su u skladu sa podacima da indukcija autofagije aktivacijom JNK/Bcl-2/beklina-1 učestvuje u diferencijaciji monocita u makrofage pod dejstvom GM-CSF (Zhang i sar., 2012). Takođe, kompleks beclin-1 i VPS34 indukuje autofagiju koja učestvuje u diferencijaciji HL-60 ćelija vitaminom D3 (Wang i sar., 2008). Rezultati ove disertacije su pokazali da JNK fosforilacijom Bcl-2 na serinu 70 promovise disocijaciju kompleksa beclin-1 i Bcl-2 što je u skladu sa prethodnim studijama (Patingre i sar., 2009, Wei i sar., 2008).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da ERK i JNK učestvuju u makrofagnoj diferencijaciji HL-60 ćelija tretiranih sa PMA. Ovaj rezultat je u skladu sa podacima da je ERK neophodan u diferencijaciji različitih leukemijskih ćelijskih linija pod dejstvom PMA (Johnson i sar., 2008, Miranda i sar., 2002) kao i u diferencijaciji leukemijskih ćelija pod uticajem različitih agenasa (Yen i sar., 2020, Shao i sar., 2016, Fang i sar., 2013, Sharma i sar., 2021, Wang i sar., 2001).

Takođe, poznato je da JNK učestvuje u diferencijaciji leukemijskih ćelija sa PMA i vitaminom D3 (Lam i sar., 2018, Wang i sar., 2005). Pored uloge ERK i JNK u diferencijaciji leukemijskih ćelija u ovoj disertaciji, poznato je da ERK i JNK učestvuju u diferencijaciji mijeloidnih prekursora koštane srži u makrofage (Richardson i sar., 2015, Himes i sar., 2006). Međutim, studije takođe pokazuju da ERK i JNK učestvuju i u proliferaciji i preživljavanju ćelija AML (Morgan i sar., 2001, Moon i sar., 2009).

Pored značajne uloge ERK i JNK u aktivaciji autofagije i diferencijacije HL-60 ćelija sa PMA, u ovoj disertaciji pokazano je da RKV učestvuju u aktivaciji ovih procesa. Poznato je da RKV aktivacijom ERK i JNK indukuju transkripciju gena koji aktiviraju makrofagu diferencijaciju pod dejstvom PMA (Lam i sar., 2018, Yiang i sar., 2015). Rezultati navedenih studija su u skladu sa rezultatima ovog istraživanja koje je pokazalo da su RKV uključene u diferencijaciju HL-60 ćelija sa PMA aktivacijom ERK i delimično aktivacijom JNK. U ovom modelu diferencijacije je pokazano da RKV stimulišu konverziju LC3-I u LC3-II, ali ne utiču na promenu u nivou p62 što je u saglasnosti sa studijama u kojima su RKV indukovale autofagiju aktivacijom ERK i JNK (Kim i sar., 2017, Zhou i sar., 2014).

Prethodna istraživanja pokazala su da autofagija može da promovise proliferaciju ili diferencijaciju ćelija AML. Pokazano je da smanjen ili pojačan intenzitet autofagije doprinosi razvoju akutne mijeloidne leukemije (Jin i sar., 2018, Watson i sar., 2015, Du i sar., 2020, Zou i sar., 2017). Indukcija autofagije je važna i u degradaciji različitih onkoproteina koji sprečavaju diferencijaciju ćelija (Isakson i sar., 2010, Larrue i sar., 2016, Du i sar., 2020). Imajući u vidu da je AML heterogena bolest, ERK, JNK i autofagija mogu da imaju protumorsko ili tumor-supresorsko dejstvo, u zavisnosti od tipa AML. Rezultati ovog istraživanja su pokazala da ERK, JNK i autofagija zajedno promovise makrofagu diferencijaciju HL-60 ćelija pod dejstvom PMA.

#### **E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

*Milos Mandic, Maja Misirkic Marjanovic, Ljubica Vucicevic, Maja Jovanovic, Mihajlo Bosnjak, Vladimir Perovic, Biljana Ristic, Darko Ciric, Ljubica Harhaji-Trajkovic, Vladimir Trajkovic. MAP kinase-dependent autophagy controls phorbol myristate acetate-induced macrophage differentiation of HL-60 leukemia cells. Life Sciences (2022) 297:120481. M21 IF: 6.78*



## **F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „Interakcija mitogenom aktiviranih protein kinaza i autofagije u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage forbol-12-miristat-13-acetatom“ predstavlja originalni naučni doprinos u izučavanju povezanosti između autofagije i MAP kinaza, kao i njihove uloge u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage. Rezultati ovog istraživanja doprinose rasvetljavanju molekularnih mehanizama autofagije i njene regulacije MAP kinazama, što predstavlja bitan doprinos u fundamentalnim istraživanjima autofagije. Ispitivanje molekularnih mehanizama autofagije zavisne od MAP kinaza u diferencijaciji leukemijskih ćelija u makrofage moglo bi da doprinese otkrivanju ciljnih molekula čija bi modulacija povećala efikasnost diferencijacione terapije.

Ova doktorska disertacija je urađena u skladu sa svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju kandidata master molekularnog biologa i fiziologa Miloša Mandića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 6.12.2022.

### **Članovi komisije:**

Doc. dr Vladimir Perović

---

Doc. dr Darko Ćirić

---

N. Sar. dr Biljana Ristić

---

V. N. Sar. dr Ljubica Vučićević

---

Prof. dr Silvana Andrić

---

**Mentor:** Prof. dr Vladimir Trajković

### **Komentor:**

N. Sar. dr Maja Misirkić Marjanović

---