

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 22.12.2017. godine, broj 5940/14, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Uticaj etil estra cikloheksil analoga etilendiamin dipropanske kiseline na ćelije melanoma miša *in vitro* i *in vivo*“**

kandidata dr Anđelke Isaković, zaposlene na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor je doc. dr Sonja Misirlić Denčić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Aleksandra Isaković, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. dr Maja Misirkić-Marjanović, naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu
3. Prof. dr Ivanka Zelen, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu

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 dr Anđelke Isaković napisana je na ukupno 150 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno šest shema, jedan grafik, četiri tabele i trideset i dve slike. Doktorska disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji, kao i pregled sadržaja, spisak shema, grafika, tabela i slika. Na početku disertacije navedene su i korišćene skraćenice, dok se na kraju disertacije u formi priloga (I i II) nalazi pregled korišćenih hemikalija i reagenasa kao i opreme i potrošnog materijala.

U **uvodu** kandidat opisuje maligni melanomom, njegovu incidencu i značaj u morbititetu i mortalitetu svetske i naše populacije. Detaljno su prikazane karakteristike melanocita, ćelija

od kojih melanom vodi poreklo. Objašnjena je genetička osnova za nastanak melanoma i poremećaji u prenosu signala koji se javljaju u maligno izmenjenim melanocitima. Navedeni su epidemiološki podaci o faktorima rizika za oboljevanje od melanoma, a zatim je objašnjen postupak dijagnostikovanja, moguća prognoza u odnosu na trenutak postavljanja dijagnoze kao i različite terapijske mogućnosti.

Takođe su objašnjeni preklinički modeli koji se koriste u ispitivanju novih lekova u terapiji malignih bolesti, i to modeli zasnovani na upotrebi ćelijskih kultura tj. komercijalnih ćelijskih linija, kao i animalni modeli. Detaljno su prikazane prednosti i mane dostupnih modela za proučavanje malignih bolesti sa posebnim osvrtom na prekliničke modele malignog melanoma.

U uvodu se takođe objašnjavaju i tipovi i mehanizmi ćelijske smrti, apoptoze, autofagije i nekroze. Objašnjeni su i precizirani molekularni događaji koji se nalaze u osnovi ovih procesa, njihov značaj u nastanku malignih bolesti, kao i njihov pojedinačni značaj ali i njihov međusobni odnos posebno pri hemioterapiji maligniteta.

Takođe se navodi značaj definisanja novih jedinjenja u istraživanjima vezanim za terapiju malignih bolesti, uz poseban osvrt na doprinos jedinjenja koja sadrže etilendiaminsku grupu kakav je i estar čije je antimelanomsko dejstvo predmet istraživanja ove disertacije.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Obuhvataju ispitivanja citotoksičnog dejstva etil estra cikloheksil analoga etilendiamin dipropanske kiseline (EE) na B16 ćelijama melanoma miša, kao i utvrđivanje tipa ćelijske smrti i molekularnih mehanizama koje ovo jedinjenje pokreće na datim ćelijama. Takođe, kao cilj se navodi i ispitivanje antimelanomskog efekta EE-a na modelima supkutanog i metastatskog melanoma miša.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o eksperimentalnoj studiji koja podrazumeva rad na mišjim i humanim ćelijskim linijama i eksperimentalnim životinjama, C57Bl/6 miševima. Detaljno su opisane metode svih eksperimenata koji ispituju citotoksičnost ispitivanog jedinjenja kao i molekularne mehanizme ćelijske smrti. Takođe su navedene sve potrebne hemikalije, reagensi za izvođenje eksperimentalnih procedura i svi korišćeni aparati i instrumenti. Rad sa eksperimentalnim životinjama je odobren od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, a sve eksperimentalne procedure sa životinjama su jasno i detaljno objašnjene. Opisan je i način dobijanja, analize, statističke obrade i predstavljanja svih eksperimentalnih rezultata.

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

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

**Zaključci** odgovaraju postavljenim ciljevima i sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** je savremena i aktuelna i sadrži spisak od 236 referenci.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

U okviru segmenta istraživanja koji je izveden na *in vitro* modelima kultura ćelija, rezultati ove disertacije su pokazali da je EE delovao citotoksično na ćelije melanoma miša kao i na ćelije melanoma čoveka u *in vitro* uslovima, a što je pokazano korišćenjem različitih testova vijabiliteta. Posebno je značajno da je isto jedinjenje pokazalo i zadovoljavajuću selektivnost u odnosu na mišje i humane netumorske ćelijske linije - mišje makrofage i humane plućne fibroblaste i humane keratinocite. EE je uzrokovao morfološke promene, vizualizovane upotrebom fluorescentne i transmisiona elektronske mikroskopije, koje su karakteristične za ćelijsku smrt po tipu apoptoze: smanjenje ćelijskog volumena i volumena jedara, kondenzanciju hromatina i fragmentaciju jedra. Ispitivanjem mehanizma delovanja EE na B16 ćelije melanoma miša metodom protočne citofluorimetrije je pokazano da on indukuje: depolarizaciju mitohondrija koja je praćena produkcijom slobodnih kiseoničnih radikala, zatim aktivaciju kaspaza i eksternalizaciju fosfatidil serina ćelijske membrane, kao i fragmentaciju jedarne DNK. Pored toga, imunoblot metodom je u lizatu tretiranih B16 ćelija dokazana aktivna kaspaza 3, kao još jedan biohemijski događaj koji je, pored prethodno navedenih, specifičan za apoptozu. U većini eksperimenta je kao pozitivna kontrolna i kao zlatni standard među hemioterapeuticima koji indukuje smrt ćelija po tipu apoptoze, korišćen cisplatin. U odnosu na njega, EE se pokazao kao superioran u pogledu intenziteta aktivacije kaspaza, eksternalizacije fosfatidil serina i fragmentacije jedarne DNK. Odsustvo porasta broja kiselih vezikula u tretiranim B16 ćelijama, merenje količine proteina ključnih za autofagiju (beklin 1, LC3-II i p62) i modulacija procesa autofagije korišćenjem farmakoloških inhibitora amonijum hlorida i bafilomicina, ukazali su da autofagija nije od značaja za *in vitro* efekte EE-a. Takođe, nekroza, iako utvrđena, nije okarakterisana kao primarni mehanizam kojim EE deluje citotoksično na B16 ćelije s obzirom na to da je broj mrtvih, tripan plavim obojenih ćelija, bio statistički značajno veći od broja nekrotičnih ćelija tj. ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane što je pokazano testom aktivnosti laktat dehidrogenaze. Pored

ispitivanja molekularnog mehanizma ćelijske smrti, u *in vitro* segmentu ove disertacije ispitana je i sposobnost B16 ćelija koje su tretirane EE-om da migriraju. U tom pogledu se ističe rezultat koji ukazuje na to da EE *in vitro* smanjuje migratornu sposobnost B16 melanomskih ćelija, što u *in vivo* okolnostima odgovara sposobnosti tumorskih ćelija da stvaraju udaljene sekundarne depozite.

Korišćenjem *in vivo* modela malignog melanoma koji je indukovao C57/B16 miševima, pokazano je da EE nije ispoljio sistemske toksične efekte. EE nije remetio normalnu funkciju kostne srži, jetre i bubrega miševa. Pored toga, EE je ostvario pozitivne efekte kao antimelanomski agens tako što je smanjio veličinu i zapreminu supkutanog melanoma tretiranih miševa. Dodatno, analizom uzoraka tumorskog tkiva melanoma miševa utvrđeno je da je EE i *in vivo* pokrenuo apoptozu u tumorskom tkivu, i to modulacijom ekspresije gena *Bcl-2* familije pomeranjem ravnoteže na stranu proapoptotskih članova ove familije, uz imunoblotom dokazanu aktivaciju kaspaza i potvrđeno odsustvo autofagije u tkivu tumora. Međutim, EE nije ostvario pozitivan efekat na smanjenje broja metastatskih nodusa melanoma u plućima tretiranih miševa.

### **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

U cilju inicijalnog ispitivanja potencijalnog citotoksičnog efekta EE-a na ćelijama melanoma miša korišćena su tri različita testa vijabiliteta: kisela fosfataza (AcP), MTT i sulforodamin B (SRB) test. SRB esej se trenutno koristi kao izabrani od strane Nacionalnog instituta za maligne bolesti, Sjedinjene Američke Države, u skriningu i odabiru novih potencijalnih lekova u terapiji malignih oboljenja [Developmental therapeutic program NCI/NIH 2015]. Dobijene  $IC_{50}$  vrednosti za EE su bile reda veličine 15-20  $\mu M$ , za sva tri korišćena eseja, što je ukazalo da izbor testa vijabiliteta ne utiče značajno na dobijene rezultate. EE je pokazao veći citotoksični efekat na ćelijama melanoma miša u poređenju sa klasičnim antitumorskim lekom cisplatinom za koga je u ovom istraživanju dobijena  $IC_{50}$  vrednost bila oko 4 puta veća od  $IC_{50}$  vrednosti dobijene za EE, dok se u literaturi pominju i do 8 puta veće koncentracije [Alemón-Medina et al, 2011]. U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da iako citotoksičan, EE pokazuje zadovoljavajuću selektivnost tj. manje je toksičan za zdrave makrofage miša u odnosu na melanomske mišje ćelije. Takođe, EE je izazvao i smrt ćelija humanog melanoma, ali su i ovom prilikom humani immortalizovani keratinociti i plućni fibroblasti bili skoro dvostuko manje osetljivi. U skladu sa ovim rezultatom je i prethodno istraživanje koje pokazuje da EE ostvaruje slabije citotoksično dejstvo na mononuklearne

ćelije periferne krvi zdravih osoba u odnosu na leukemijske ćelije pacijenata [Misirlic Dencic et al, 2012].

Posmatranjem obojenih ćelijskih jedara tretiranih B16 ćelija pod fluorescentnim mikroskopom, a zatim mikrostrukturnih promena elektronskom mikroskopijom, uočene su promene karakteristične za apoptotski proces [Galluzzi et al, 2012]. EE je već nakon 8 h tretmana doveo do eksternalizacije fosfatidil serina u spoljašnji sloj lipidnog dvosloja ćelijske mebrane B16 ćelija, čemu je prethodila aktivacija kaspaza, glavnih izvršnih molekula u apoptozi. Dodatno, pokazano je da 8 h od početka tretmana postoji povećana aktivacija dve inicijatorne kaspaze 8 i 9. Kaspaza 8 pripada spoljašnjem putu aktivacije apoptoze, dok kaspaza 9 pripada unutrašnjem putu koji podrazumeva oštećenje mitohondrija [Julien and Wells, 2017]. Ovaj rezultat ukazuje da EE pokreće apoptozu aktiviranjem tzv. kombinovanog, i spoljašnjeg i unutrašnjeg puta, koji se spominje u literaturi kao mehanizam citotoksičnog proapoptotskog dejstva određenih ekstrakata biljaka i njihovih konstituenata na leukemijske ćelije [Kumar et al, 2008]. Aktivnost izvršne kaspaze 3 je potvrđena i imunoblot metodom. Indukcija apoptoze je potvrđena i analizom ćelijskog ciklusa nakon tretmana EE-om, pri čemu nakon 48 h dolazi do fragmentacije jedarne DNK u B16 ćelijama. Značajno je istaći da je EE bio efikasniji u izazivanju promena tipičnih za apoptozu u odnosu na cisplatin, hemioterapeutik koji je u kliničkoj upotrebi više decenija i danas se koristi kao jedini ili kao deo protokola sa više lekova u terapiji velikog broja malignih bolesti kod ljudi [Dasari and Tchounwou, 2014]. Naime, EE je indukovao depolarizaciju unutrašnje mitohondrijalne membrane svega 30 minuta nakon početka tretmana i porast u produkciji reaktivnih vrsta kiseonika 2 h od početka tretmana, što svedoči o prisutnom oksidativnom stresu. Značajno je da apoptoza kao mehanizam ćelijske smrti koji EE pokreće nije specifična za vrstu, kao ni za tip ćelije. Naime, svoje antileukemijsko dejstvo EE takođe ostvaruje pokretanjem apoptoze, ali posredovane AIF-om i stoga nezavisne od kaspaza [Misirlic Dencic et al, 2012]. Sa druge strane, kompleksiranje EE-a sa platinom, očigledno moduliše dejstvo ovog jedinjenja, jer Pt(IV) kompleks koji sadrži EE indukuje masivnu vakuolizaciju citoplazme praćenu morfološkim i biohemijskim karakteristikama nalik nekrozi u ćelijama humanog glioma *in vitro* [Lazić et al, 2010], kao i ćelijsku smrt po tipu nekroze u humanim leukemijskim ćelijama *in vitro* [Misirlić Denčić et al, 2017]. U kontekstu malignih bolesti, veliki je broj istraživanja koja ukazuju da je autofagija u tumorima protektivni proces koji promovise rast tumora, a brojni su i dokazi da je ovaj proces u osnovi rezistencije na različite hemioterapeutike [Guo et al, 2011]. U tom smislu, ispitivan je uticaj inhibitora autofagije,

amonijum hlorida i bafilomicina, na citotoksično dejstvo EE i pokazano da ovakva modulacija autofagije nema uticaja na citotoksično dejstvo EE-a na ćelije melanoma miša. Takođe je pokazano i da sam EE ne indukuje autofagiju u tretiranim ćelijama pošto nije doveo do povećanja broja kiselih vezikula u tretiranim ćelijama niti je doveo do promena u nivoima beclin-1, LC3-II i p62 proteina koji bi odgovarali pokretanju autofagije u tretiranim B16 ćelijama melanoma miša. Kako indukcija nekroze u tumorskim ćelijama može u terapijskom smislu imati i pozitivan ali i negativan efekat, integritet ćelijske membrane je ispitan utvrđivanjem aktivnosti laktat dehidrogenaze u supernatantu tretiranih B16 ćelija. Rezultati ovog testa su nametnuli zaključak da nekroza nije primarni mehanizam smrti koji EE pokreće, a prisustvo ćelija sa oštećenom ćelijskom membranom se može objasniti tzv. sekundarnom nekrozom koja nastaje u *in vitro* uslovima nakon apoptoze u odsustvu fagocita [Rogers et al, 2017]. Ispitana je i sposobnost B16 ćelija da migriraju, korišćenjem tzv. *scratch* eseja kojim se u *in vitro* uslovima procenjuje migratorna sposobnost ćelija tj. u slučaju tumorskih ćelija, predviđa njihova sposobnost metastaziranja *in vivo* [Liang et al, 2007]. Uzimajući u obzir stopu metastaziranja malignog melanoma i lošu prognozu pacijenata sa uznapredovalim stadijumom bolesti, kao posebno značajan se ističe rezultat kojim je pokazano da EE skoro u potpunosti inhibira migratornu sposobnost ćelija melanoma miša *in vitro*.

U okviru *in vivo* segmenta ovog istraživanja, pokazano je da EE nije bio toksičan za kostnu srž, jetru i bubrege zdravih miševa, dok je pokazao i značajan antimelanomski efekat, smanjivši veličinu, zapreminu i masu primarnih supkutanih tumora i to aktivacijom apoptoze, kao i *in vitro*. Naime, analizom ekspresije gena u tumorskom tkivu pokazano je da je EE indukovao transkripciju proapoptotskog gena *Bax* čiji proteinski proizvod ima glavnu ulogu u formiranju Bax/Bak pore na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, odnosno u permeabilizaciji spoljašnje mitohondrijalne membrane (MOMP) [Cosentino and García-Sáez, 2017]. Bax u uslovima pokretanja apoptotskog procesa dovodi i do povećanja produkcije reaktivnih vrsta kiseonika [Altieri, 2015], što može biti jedno od objašnjenja za detektovan oksidativni stres u B16 ćelijama melanoma nakon tretmana EE-om. Takođe, transkripcija gena koji kodiraju tzv. *BH3-only* proteine je povećana nakon tretmana EE-om, i to gena *Bcl2l11*, kao i gena *Bad*. Produkt gena *Bcl2l11*, koji se naziva i Bim, se vezuje za antiapoptotski Bcl-2 i time onemogućava njegov inhibitorni efekat na Bax/Bak oligomerizaciju. On inhibira i druge antiapoptotske Bcl-2 proteine (Mcl-1, Bcl-xL), a može i direktno indukovati Bax/Bak oligomerizaciju [Adams and Cory, 2017]. Zaključeno je da EE pomera ravnotežu između proapoptotskih i antiapoptotskih članova Bcl-2 familije u korist

proapoptotskih, pri čemu verovatno veću ulogu ima inhibicija antiapoptotskih članova od strane *BH3-only* članova nego direktna stimulacija proapoptotskih članova. Ovaj nalaz je u skladu sa sve većim brojem podataka iz literature koji ukazuju na to da tzv. *BH3-only* mimetici, farmakološka jedinjenja koja se ponašaju kao istoimeni proteini, postižu značajan uspeh u kliničkoj primeni u terapiji akutne mijeloidne, hronične mijeloidne i hronične limfoblastne leukemije, a veliki je broj kliničkih studija I i II faze koji ispituju njihovu efikasnost kod solidnih tumora [Adams and Cory, 2017]. Analiza ekspresije gena koji su uključeni u proces autofagije, *Atg4b*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg12*, *Becn1* i *Sqstm1* u tumorskom tkivu je potvrdila *in vitro* rezultate kojima je pokazano da autofagija nema značajnu ulogu u mehanizmu ćelijske smrti koju EE pokreće, jer se ekspresija ovih gena nije razlikovala između grupe miševa koji su primali EE i kontrolne grupe. Merenjem količine beclin 1 proteina, LC3-II i p62 proteina značajnih za autofagiju u tumorskom tkivu melanoma životinja koje su primale EE i onih koje nisu je takođe potvrđeno da ispitivano jedinjenje ne utiče na proces autofagije.

Metastatski model melanoma je uspostavljan injektiranjem B16 ćelija u repnu venu životinja, pri čemu su životinje od tog dana u naredne dve nedelje primale EE, što u potpunosti ne odgovara prirodnom toku bolesti kod ljudi, ali se ovakav tretman smatra značajnim kod pretkliničkog ispitivanja novih agenasa u cilju boljeg razumevanja svih potencijalnih efekata [Wartha et al, 2014]. Pokazano je da EE nije imao uticaj na ponašanje i telesnu masu životinja u toku trajanja eksperimenta, ali nije ni doveo do smanjenja broja metastatskih nodusa u plućima miševa.

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

Andjelka M. Isakovic, Sasa M. Petricevic, Slavica M. Ristic, Dusan M. Popadic, Tamara K. Kravic-Stevovic, Nevena S. Zogovic, Jelena M. Poljarevic, Tatjana V. Zivanovic Radnic, Tibor J. Sabo, Aleksandra J. Isakovic, Ivanka D. Markovic, Vladimir S. Trajkovic, Sonja T. Misirlic-Dencic. **In vitro and in vivo antimelanoma effect of ethyl ester cyclohexyl analog of ethylenediamine dipropanoic acid.** Melanoma Research (2018) 28(1):8-20.

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

Rezultati ovog istraživanja imaju značajan naučni doprinos jer pregledno objašnjavaju detaljan molekularni mehanizam u osnovi antimelanomskog delovanja potencijalnog

hemioterapeutskog agensa koji je pri tom organsko jedinjenje tj. estar. Sveobuhvatnost pristupa analizi citotoksičnog dejstva koja je uključila kako analizu morfoloških promena, upotrebom fluorescentne i transmisiona elektronske mikroskopije, tako i analizu funkcionalnih promena korišćenjem raznovrsnih molekularno-bioloških tehnika (različitih testova vijabiliteta, protočne citometrije, imunoblot metode) predstavlja primer temeljnog i dobro osmišljenog istraživanja mehanizma delovanja supstance sa potencijalnim antitumorskim dejstvom *in vitro*. U eksperimentima su korišćene i odgovarajuće pozitivne kontrole što je upotpunilo interpretaciju dobijenih rezultata. Dodatni značaj ima sveobuhvatno ispitivanje zastupljenosti svakog od tri moguća osnovna modaliteta ćelijske smrti: apoptoze, autofagije i nekroze. Kao posebno važno izdvaja se ispitivanje uticaja ovog jedinjenja na migratornu sposobost B16 ćelija što može da sugeriše sposobnost metastaziranja *in vivo*. Nije zanemareno ni ispitivanje selektivnosti delovanja tj. uticaj ovog estra na maligno neizmenje ćelije. Ipak, najznačajniji doprinos je svakako ispitivanje efikasnosti delovanja ovog estra na dva odgovarajuća mišja modela: supkutanom i metastatskom melanomu uz utvrđivanje toksičnog dejstva na kostnu srž, jetru i bubrege zdravih miševa. Dobijeni rezultati koji upućuju na odsustvo toksičnosti i dobru proapoptotsku *in vivo* antimelanomsku efikasnost otvaraju prostor za dalja istraživanja u ovoj oblasti koja bi mogla doprineti aktuelnim naporima u razvoju novog antimelanomskog agensa koji bi imao bolje karakteristike od onih koji su trenutno u upotrebi.

Doktorska disertacija „Uticaj etil estra cikloheksil analoga etilendiamin dipropanske kiseline na ćelije melanoma miša *in vitro* i *in vivo*“, kandidatkinje dr Anđelke Isaković, predstavlja originalan naučni doprinos razjašnjavanju molekularnih mehanizama antimelanomskog delovanja jednog estra. Rezultati dobijeni u ovom radu su izuzetno značajni i mogu doprineti strategiji sinteze novih potencijalnih hemioterapeutika posebno u terapiji melanoma. Ova doktorska disertacija je u skladu sa svim principima dobro osmišljenog i sprovedenog naučnog istraživanja. Po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, pažljivo odabranom naučnom pristupu, iskorišćenoj savremenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaključcima, kao i obilju korišćene literature, ispunjava sve kriterijume dobro napisanog naučnog rada.

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 dr Anđelke Isaković i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

**Članovi Komisije:**

---

Prof. dr Aleksandra Isaković

---

Dr sci. Maja Misirkić-Marjanović,  
naučni saradnik

---

Prof. dr Ivanka Zelen

**Mentor:**

---

Doc. dr Sonja Misirlić Denčić

U Beogradu, \_\_\_\_\_.