

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16-DĐ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uticaj reaktivnih vrsta kiseonika na aktivnost mTOR signalnog puta kod pacijenata sa mijeloproliferativnim neoplazmama“

kandidata Mr dr Dragoslave Đikić, zaposlene u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Mentor je Prof. dr Andrija Bogdanović, a komentor V.N. Sar. dr Dragana Marković.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Marija Plješa Ercegovac, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Ana Vidović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. N.Sav. dr Vladan Čokić, Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

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 Mr dr Dragoslave Đikić napisana je na ukupno 142 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 10 tabela, 62 grafikona i 23 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji.

U **uvodu** je definisano šta su hronične mijeloproliferativne neoplazme (HMN) i navedena je klasifikacija ovih hematoloških maligniteta. Poseban, detaljniji prikaz

karakteristika dat je za hroničnu mijeloidnu leukemiju (HML) i Filadelfija hromozom negativne HMN (Ph⁺HMN) koje obuhvataju esencijalnu trombocitemiju (ET), policitemiju veru (PV) i primarnu mijelofibrozu (PMF). Na adekvatan način je opisana molekularna osnova maligne transformacije u ovim HMN, u skladu sa dosadašnjim saznanjima. Navedeni su PI3K/AKT i mTOR signalni putevi koji su konstitutivno aktivirani usled onkogenih događaja u HMN. Prikazane su karakteristike oksidativnog stresa, opisane su reaktivne vrste kiseonika i azota, sistem antioksidativne zaštite i oksidativna oštećenja biomolekula. Potom su prikazana dosadašnja saznanja vezana za oksidativni stres u HMN.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite pacijenata sa HMN i određivanja aktivnosti AKT i mTOR kinaze u granulocitima i kostnoj srži pacijenata i odgovarajućih kontrola. Takođe kao cilj rada navedeno je i *in vitro* ispitivanje uticaja različitih koncentracija oksidanasa na proliferaciju, ćelijski ciklus i aktivnost AKT i mTOR kinaza eritroleukemijskih HEL92.1.7. ćelija kao i na aktivnost mTOR signalnog puta u granulocitima pacijenata sa HMN.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je obuhvatila obolele od HMN, sprovedenoj u saradnji sa Klinikom za hematologiju, Kliničkog centra Srbije. Detaljno je opisan način izbora pacijenata i kontrolne grupe, kao i kriterijumi za uključanje u studiju. Pacijentima je uziman biološki materijal koji je adekvatno transportovan i obrađivan u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključanja u studiju. Potom su jasno navedene sve metode korišćene u studiji, uz navođenje statističkih metoda korišćenih za deskripciju i analizu dobijenih 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 sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 243 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Kod pojedinačnih podtipova HMN postojale su značajne razlike u pogledu aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPx) bila je smanjena u eritrocitima većine podtipova HMN, dok je aktivnost katalaze (CAT) bila smanjena jedino kod bolesnika sa HML. Ukupan antioksidativni kapacitet plazme i aktivnost CAT u eritrocitima imali su najveće vrednosti kod bolesnika sa PMF. Uticaj *JAK2V617F* mutacije na aktivnost antioksidativnih enzima bio je najizraženiji kod bolesnika sa PV.

Koncentracije malondialdehida (MDA) i protein karbonila (PK), pokazatelja oksidativnih oštećenja lipida i proteina u cirkulaciji, bile su povišene u HMN. Koncentracija ukupnih nitrita i nitrata (NOx) bila je povećana kod PMF bolesnika u poređenju sa zdravim ispitanicima i drugim HMN entitetima. Uz povećanu produkciju reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i reaktivnih vrsta azota (RNS) kod PMF bolesnika bila je povećana i antioksidativna zaštita. Ovo su prvi rezultati koji ukazuju da bi stanje adaptacije na oksidativni stres kod HMN moglo da dovede do progresije bolesti.

Ekspresija ROS, nitrotirozina i iNOS bila je povećana u granulocitima većine bolesnika sa HMN.

Analiza ekspresije markera oksidativnih oštećenja molekula i aktivnosti antioksidanasa pokazala je postojanje oksidativnog stresa kod HMN, kome mogu doprineti i ROS i RNS. U takvim uslovima detektovan je povećan stepen aktivacije AKT i mTOR kinaza u granulocitima većine bolesnika sa HMN u poređenju sa kontrolama. Povećana ekspresija pS6K, nishodnog efektor mTOR kinaze, pozitivno je korelirala sa ekspresijom pmTOR i aktivacijom AKT u granulocitima. Aktivacija mTOR kinaze u kostnoj srži bila je povećana jedino kod bolesnika sa PMF.

U *in vitro* uslovima pokazano je da vodonik peroksid (H_2O_2) stimulatивно deluje na aktivaciju mTOR kinaze, kao i na ekspresiju iNOS i nitrotirozina, u granulocitima bolesnika i zdravih kontrola. Granulociti bolesnika ispoljili su veću otpornost na citotoksično delovanje H_2O_2 u odnosu na zdrave ispitanike. Tretman HEL ćelija sa H_2O_2 doveo je do aktivacije AKT i mTOR kinaze, dok je dugotrajni tretman oksidansom AAPH, koji je izvor peroksil radikala, prouzrokovao porast aktivnosti jedino mTOR kinaze. Inhibicija mTOR kinaze rapamicinom značajno je smanjila broj HEL ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa i doprinela smanjenju

vijabilnosti HEL ćelija nakon primene H₂O₂. Dobijeni rezultati su ukazali na stimulatívno dejstvo mTOR kinaze na proliferaciju i preživljavanje ćelija u uslovima oksidativnog stresa.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Zajednička karakteristika maligniteta je povećana koncentracija ROS. Prisustvo *BCR/ABL* onkogeni i *JAK2V617F* mutacije indukuju stvaranje ROS u hematopoetskim matičnim ćelijama (HMC) što dovodi do poremećaja ćelijskog ciklusa, diferencijacije i genomske nestabilnosti (Koptyra i sar, 2006; Marty i sar, 2013). Oksidativno oštećenje DNK smatra se inicijalnim događajem u procesu kancerogeneze. Maligne ćelije su često otpornije na oksidativni stres jer u cilju adaptacije na izmenjene uslove sredine povećavaju stepen antioksidativne zaštite.

Kod HMN ispitanika obuhvaćenih ovim istraživanjem narušen je balans između koncentracije oksidativno izmenjenih makromolekula i aktivnosti sistema antioksidativne zaštite. Koncentracije MDA i PK u plazmi pacijenata bile su veće u poređenju sa kontrolama. Ahmad i saradnici su 2010. godine pokazali povećane vrednosti MDA i PK kod HML pacijenata u svim fazama bolesti praćene padom aktivnosti neenzimske komponente antioksidativne zaštite. Predmet ispitivanja ove studije bili su antioksidativni enzimi u eritrocitima pri čemu su uočene značajne razlike u njihovoj aktivnosti između pojedinačnih podtipova HMN. Najslabiji kapacitet antioksidativne zaštite ispoljili su pacijenti sa HML kod kojih je zabeležen pad aktivnosti CAT, SOD i GPx. Ranije je pokazano da dugotrajna aktivacija STAT5 transkripcionog faktora putem *BCR/ABL* kinaze smanjuje intracelularnu ekspresiju CAT (Bourgeais i sar., 2017). PMF pacijenti imali su najveći ukupni antioksidativni kapacitet plazme, kao i aktivnost CAT. U istraživanjima drugih autora, povećana adaptacija na oksidativni stres u PMF, kao podmakloj fazi bolesti, ogledala se u većoj ekspresiji CAT na genskom i proteinskom nivou, u poređenju sa druga dva Ph⁺HMN entiteta (Hasselbalch i sar., 2014; Čokić i sar., 2015).

Kako su aktivnosti azot monoksida (NO) i RNS u procesu hronične inflamacije i kancerogeneze često neodvojive od dejstva ROS, u ovoj studiji je na osnovu koncentracije nitrita i nitrata u plazmi, procenjen doprinos NO komponente oksidativnom i nitrozativnom stresu. Pacijenti sa PMF su imali značajno veće vrednosti NO_x u odnosu na sve grupe ispitanika, ukazujući da su ROS i NO važni za progresiju bolesti. Koncentracije NO_x u plazmi HMN pacijenata bile su u pozitivnoj korelaciji sa povećanom ekspresijom iNOS u

granulocitima. Nitrotirozin kao stabilni, krajnji produkt metabolizma NO i marker kumulativne aktivnosti iNOS pojačano se eksprimirao u granulocitima HMN pacijenata. Onkogeno delovanje povećane ekspresije iNOS dovodi se u vezu sa sintezom NO i posledičnom aktivacijom mTOR signalnog puta (Lopez-Riviera i sar., 2014).

Modifikacija proteina putem ROS i RNS predstavlja osnovu signalizacije zasnovane na redoks reakcijama. Paralelno sa analizom oksidativnog statusa u svim grupama ispitanika opisana je aktivnost AKT/mTOR signalnog puta. Step en aktivacije AKT serin-treonin kinaze u granulocitima bio je povećan kod PV i PMF pacijenata što je u skladu sa rezultatima drugih autora koji su pokazali konstitutivnu aktivaciju PI3K/AKT signalnog puta kod Ph^+ i Ph^- HMN (Kim JH i sar., 2005; Grimwade L i sar., 2009). U okviru ove doktorske studije određivana je aktivna forma mTOR kinaze prisutna u mTORC1 kompleksu granulocita, kao i ekspresija aktivne S6 kinaze smeštene nishodno u signalnom putu. Većina HMN pacijenata imala je povećanu aktivaciju kinaza u poređenju sa kontrolama. Nekoliko studija pokazalo je da je funkcija mTOR kinaze regulisana ćelijskim redoks statusom, pri čemu oksidativni stres može imati stimulatívno ili inhibitorno dejstvo (Sarbasov DD i Sabatini DM, 2005; Yoshida S i sar., 2011).

Aktivnost mTOR kinaze kao i ekspresija iNOS i nitrotirozina u granulocitima HMN pacijenata bili su povećani nakon *in vitro* tretmana sa H_2O_2 . U eksperimentalnom delu studije pokazano je da se kod maligno transformiranih ćelija menja senzitivnost kinaze na promene redoks potencijala, kao i senzitivnost samih ćelija na prisustvo oksidativnog stresa. Naime, granulociti bolesnika ispoljili su veću otpornost na citotoksično delovanje H_2O_2 u odnosu na zdrave ispitanike. Ove ćelije verovatno nastaju selekcijom koja je sastavni deo kancerogeneze kad povećana produkcija ROS favorizuje proliferaciju malignog klona rezistentnog na oksidativni stres (Manda G i sar., 2009).

Deo eksperimenta urađen na HEL ćelijama omogućio je ispitivanje uticaja različitih doza i vremena delovanja oksidanasa na aktivnost mTOR kinaze. Manje doze H_2O_2 stimulatívno su delovale na kinazu, dok je kontinuirana izloženost oksidansima (AAPH i višekratni tretman sa H_2O_2) uvela ćelije u stanje reparacije ili adaptacije na visoke koncentracije ROS, kako je već ranije opisano u radu Davies i saradnika (2000). Nakon tretmana sa H_2O_2 porastao je broj HEL ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa što odgovara rezultatima studije Tothove i saradnika (2007) prema kojima su određene količine ROS neophodne za pokretanje ćelijskog ciklusa kod HMC. PI3K/AKT/mTOR signalni put ima

ključnu ulogu u aktivaciji ciklina D, ciklin zavisne kinaze 4 i fosforilaciji retinoblastoma važnih za propagaciju kroz G1 fazu ćelijskog ciklusa (Gao i sar., 2004). Na eksperimentalnom modelu HEL ćelija tretiranih sa H₂O₂ pokazano je stimulatívno dejstvo mTOR kinaze na proliferaciju i preživljavanje ćelija u uslovima oksidativnog stresa.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Djikić D, Marković D, Bogdanović A, Mitrović-Ajtić O, Subotićki T, Diklić M, Beleslin-Cokić B, Bjelića S, Kovačić M, Čokić VP. Oxidative and nitrosative stress in myeloproliferative neoplasms: the impact on the AKT / mTOR signaling pathway. JBUON 2018. (in press)

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uticaj reaktivnih vrsta kiseonika na aktivnost mTOR signalnog puta kod pacijenata sa mijeloproliferativnim neoplazmama“ Mr dr Dragoslave Đikić, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju prirode i porekla ROS kod pacijenata sa mijeloproliferativnim neoplazmama i njihovog uticaja na aktivaciju redoks-senzitivnog mTOR signalnog puta. Prvi put se pravi detaljan osvrt na karakteristike oksidativnog stresa i aktivaciju mTOR kinaze kod raznih podtipova HMN. Dobijeni rezultati pokazuju izmenjenost mTOR signalnog puta kod ovih hematoloških maligniteta i s obzirom na njegov značaj u regulaciji ćelijskog metabolizma, rasta, proliferacije i preživljavanja ćelija, predstavljaju polaznu osnovu za buduća istraživanja o uticaju redoks potencijala na pomenute pojedinačne komponente. Objavljeni rezultati ukazuju da intracelularno redoks stanje menja fiziološko okruženje i funkciju mnogih molekula, tako da sumacija ovih promena i njihova međusobna interakcija određuju konačni rezultat delovanja ROS.

Ova doktorska disertacija je urađena prema 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 Mr dr Dragoslave Đikić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 21.06.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Marija Plješa Ercegovac

Prof. dr Ana Vidović

N.Sav. dr Vladan Čokić

Mentor:

Prof. dr Andrija Bogdanović

Komentor:

V. N. Sar. dr Dragana Marković
