

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IX редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 11.7.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Горана Брајушковић и др Тијане Станковић о урађеној докторској дисертацији Миодрага Д. Драгоја, истраживача сарадника на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, под насловом „**Ефекти инхибиције CXCR4 рецептора и фокалне адхезионе киназе у супресији инвазије и превазилажењу резистенције код неситноћелијског карцинома плућа**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Горан Брајушковић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Тијана Станковић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду и др Јелена Динић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Миодрага Д. Драгоја под насловом „**Ефекти инхибиције CXCR4 рецептора и фокалне адхезионе киназе у супресији инвазије и превазилажењу резистенције код неситноћелијског карцинома плућа**“ урађена је на Одељењу за неуробиологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, уз финансијску подршку Министарства за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије (кандидат је истраживач сарадник на пројекту ИИИИ41031).

Докторска дисертација садржи 145 страна. Пагинирани текст докторске дисертације чине следећа поглавља: **Увод** (35 страна), **Циљеви рада** (2 стране), **Материјал и методе** (22 страна), **Резултати** (53 страна), **Дискусија** (14 страна), **Закључци** (3 стране) и **Литература** (17 страна). Дисертација садржи 47 слика (6 у поглављу Увод и 41 у поглављу Резултати) и 3 табеле у поглављу Резултати. У поглављу Литература је цитирано 210 библиографских јединица. 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 истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **Увод**, кандидат Миодраг Д. Драгој, кроз четири потпоглавља даје сажет преглед података из научне литературе који се односе на проблематику докторске дисертације. У првом потпоглављу кандидат нас најпре упознаје са општим карактеристикама тумора, као и са процесима који леже у основи туморигенезе. Такође, истиче да је хетерогеност ћелија тумора узрок појаве популације ћелија које су способне да формирају метастазе и преживе терапију. У наредном потпоглављу описана је способност ћелија рака да инвадирају и метастазирају. Детаљно су описани процеси током вишестепене инвазивно-метастатске каскаде, као и гени укључени у регулацију процеса ове каскаде, као што су p53 и ПТЕН тумор супресори. Такође, посебна пажња је посвећена улози CXCR4 рецептора и фокалне адхезионе киназе (ФАК) који су одговорни за успешну колонизацију и формирање макроскопских метастаза, а чија је експресија и активност регулисана p53 и ПТЕН тумор супресорима. Како је у фокусу ове докторске дисертације и резистенција на хемиотерапију, наредно потпоглавље управо описује ћелијске механизме резистенције на цитостатике. У оквиру овог потпоглавља издваја се улога повећане експресије АБЦБ1 и АБЦЦ1 транспортера у развоју отпорности на хемиотерапију, као и доприносу активације CXCR4 рецептора и ФАК-а резистентном фенотипу. У последњем потпоглављу је представљена класификација тумора. Даље се пажња фокусира на епидемиологију, класификацију и терапију карцинома плућа, са посебним акцентом на неситноћелијски карцином плућа (НСЦЛЦ). Такође, детаљно се описује улога активације CXCR4 рецептора и ФАК молекула у метастазирању и развоју резистенције код поменутог типа карцинома плућа. Такође, приказани су и литературни подаци који показују потенцијал циљане инхибиције поменутих молекула у терапији НСЦЛЦ-а.

На основу представљених литературних података, у поглављу **Циљеви** дефинисана су три основна научна циља:

1. испитати значај CXCR4 и ФАК молекула у инвазивности НСЦЛЦ ћелија са истовремено инактивираним p53 и ПТЕН тумор супресорима, као и утицај третмана инхибиторима CXCR4 и ФАК-а на миграцију и инвазију ових ћелија.
2. испитати улогу CXCR4 и ФАК-а у резистенцији на класичне хемиотерапеутике код НСЦЛЦ ћелија са повећаном експресијом АБЦБ1 и АБЦЦ1 транспортера, као и могућност реверзије резистенције код ових ћелија применом CXCR4 и/или ФАК инхибитора у комбинацији са класичним цитостатикима.
3. испитати утицај комбинованог третмана инхибитора CXCR4 или ФАК-а са класичним хемиотерапеутицима на инвазивне способности резистентних НСЦЛЦ ћелијских линија.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** детаљно су описане све фазе експерименталног рада. У почетном делу описани су узорци туморског и одговарајућег неизмењеног ткива 30 пацијената оболелих од НСЦЛЦ-а који су оперисани на Клиници за грудну хирургију, Клиничког центра Србије, а који су коришћени у овој студији. Такође, описане су и три хумане ћелијске линије НСЦЛЦ-а (NCI-H460, NCI-H460/R,

COR-L23) коришћене у изради ове дисертације, као и начин и услови њиховог гајења.. Затим, су детаљно описани појединачни и комбиновани третмани примењивани на овим ћелијама, као и МТТ тест вијабилности коришћен за одређивање цитотоксичности лекова и инхибитора код хуманих НСЦЛЦ ћелијских линија. Представљена је методологија примене проточне цитофлуориметрије за испитивање ефеката третмана на индукцију ћелијске смрти, дистрибуцију ћелијског циклуса, акумулацију доксорубицина, β -галактозидазну активност ћелија и експресију протеина CXCR4. Детаљно су описане и процедуре изолације иРНК-а и протеина, као и методе квантитативног ПЦР-а и „Western blot“-а коришћене за анализу нивоа експресије испитиваних гена и протеина. За испитивање инвазивног и миграторног потенцијала ћелија коришћена су три теста: тест зарастања повреде, тест деградације желатина и тест инвазије. У *in vivo* експериментима коришћени су НСГ и СЦИД мишеви. НСГ мишеви су коришћени за развијање мишијег модела са субкутаном ксенографтима тумора плућа са циљем одређивања туморигеног потенцијала хуманих ћелијских линија, коришћених у овој студији. Интраплеуралном инокулацијом хуманих НСЦЛЦ ћелија код СЦИД мишева успостављен је *in vivo* ортотопни метастатски модел тумора плућа. Претходно поменути *in vivo* модел коришћен је за утврђивање антитуморске и антиметастатске активности инхибитора, која је процењивана поређењем времена преживљавања третираних животиња у односу на контролне животиње. У завршном делу овог поглавља описане су одговарајуће статистичке методе коришћене за обраду добијених резултата.

У поглављу **Резултати** детаљно су наведени подаци добијени у истраживању и јасно су представљени уз одговарајуће табеларне и илустративне приказе и пратеће статистичке анализе. Представљање резултата започиње описом успостављања *in vitro* система хуманих ћелијских линија НСЦЛЦ-а са различитим статусом p53 и ПТЕН тумор супресора. У наредном делу показано је да истовремена инхибиција p53 и ПТЕН тумор супресора доводи до активације CXCR4 рецептора и ФАК молекула и њихових нисходних сигналних путева, као и до значајног повећања инвазивног и миграторног потенцијала ћелија у испитиваном *in vitro* систему. Такође, утврђено је да специфична хемијска инхибиција CXCR4 рецептора и ФАК молекула доводи до смањења фосфорилације ФАК и АКТ протеина и коначно до смањења инвазије и миграције ћелија са инактивним p53 и ПТЕН тумор супресорима. Даље је описано успостављање *in vivo* ортотопног метастатског модела НСЦЛЦ-а у коме инокулација p53/ПТЕН дефицијентних ћелија доводи до настанка агресивних тумора који формирају метастазе у удаљеним органима и утичу на краће преживљавање животиња. Третмани инхибиторима CXCR4 рецептора и ФАК-а у оваквом *in vivo* систему доводе до тренда продуженог преживљавања животиња. Други део резултата у овом поглављу описује повезаност CXCR4 рецептора и ФАК-а са развојем резистенције НСЦЛЦ-а на класичне хемиотерапеутике. Први резултати у овом делу студије описују повезаност експресије гена *CXCR4* и *ФАК*-а са генском експресијом АБЦ пумпи, *АБЦБ1* и *АБЦЦ1*, у узорцима пацијената оболелих од НСЦЛЦ-а. Показано је да је експресија гена *АБЦБ1* повећана искључиво у узорцима код којих је повећана и експресија гена *CXCR4*, односно *ФАК*, као и да је учесталост повећане експресије гена *АБЦЦ1* статистички значајно већа код тумора који имају повећану експресију гена *ФАК*. Резултати даље описују везу поменутих гена у *in vitro* систему. Показано је да ћелијске линије НСЦЛЦ-а резистентне на хемиотерапију имају повећану експресију гена *АБЦБ1* (код NCI-H460/R ћелија), односно *АБЦЦ1* (код COR-L23 ћелија) Такође, уочено је и да се експресија CXCR4 рецептора значајно повећава након третмана резистентних ћелијских линија доксорубицином, што потврђује улогу CXCR4 рецептора и његових нисходних сигналних путева у развоју резистенције код НСЦЛЦ-а. Даље су описани резултати који

показују да инхибитори CXCR4 рецептора и ФАК молекула остварују синергистички ефекат када се појединачно комбинују са доксорубицином и успешно сензитизују обе резистентне ћелијске линије на доксорубицин. Испитујући механизам реверзије резистенције, показано је да комбиновани третмани не доводе до промене акумулације доксорубицина, нити до значајних промена у индукцији ћелијске смрти. Као главни механизми реверзије резистенције описане су значајне промене у дистрибуцији ћелијског циклуса и повећању броја резистентних ћелија НСЦЛЦ-а које улазе у ћелијско мировање, као и смањење фосфорилације ФАК и/или АКТ протеина. На крају, резултати описују да комбиновани третмани инхибитора CXCR4 и ФАК са доксорубицином значајно појачавају анти-инвазивне и анти-мигранторне ефекте инхибитора CXCR4 и ФАК-а код резистентних ћелија НСЦЛЦ-а.

У оквиру поглавља **Дискусија** кандидат је дао критички осврт на оригиналне резултате ове докторске дисертације користећи постојеће литературне податке из дате области. У првом делу овог поглавља, посебна пажња је посвећена дискутовању резултата везаних за улогу CXCR4 и ФАК сигналних путева у изразито инвазивном фенотипу p53/ПТЕН дефицијентних ћелија НСЦЛЦ-а, која је први пут описана у овом истраживању. Истакнуто је да је истовремена инактивација p53 и ПТЕН тумор супресора у ћелијама НСЦЛЦ-а одговорна за активацију CXCR4 и ФАК сигналних путева, као и да примена инхибиције поменутих сигналних путева може имати потенцијал у супресији метастатског ширења агресивних p53/ПТЕН дефицијентних тумора. Дискутовано је и о улози активације ова два сигнална пута у резистенцији НСЦЛЦ ћелија на хемиотерапеутике, као и могућност успешног превазилажење ове резистенције циљаним инхибирањем CXCR4 и ФАК протеина. Такође, дискутовано је и о ограничењима овог истраживања и истакнут је његов могући клинички значај.

У поглављу **Закључак**, кандидат је изнео концизне закључке који су проистекли из резултата истраживања:

1. CXCR4 и ФАК молекули доприносе инвазивности p53/ПТЕН дефицијентних ћелија НСЦЛЦ-а
2. Циљана инхибиција CXCR4 и ФАК молекула, у *ин витро* и *ин vivo* системима, супримира инвазивни фенотип p53/ПТЕН дефицијентних ћелија НСЦЛЦ-а, што је праћено смањењем фосфорилације ФАК и АКТ протеина.
3. CXCR4 и ФАК молекули доприносе резистенцији на класичне хемиотерапеутике код НСЦЛЦ-а са повећаним нивоом експресије АБЦ транспортера
4. Третмани CXCR4 и ФАК инхибиторима у комбинацији са доксорубицином успешно сензитизују резистентне ћелијске линије са прекомерно експримираним АБЦ транспортерима на доксорубицин, повећавајући броја резистентних ћелија НСЦЛЦ-а у *senescence*-у.
5. Комбиновани третман инхибитора CXCR4 и ФАК са доксорубицином доводи до супресије инвазије резистентних НСЦЛЦ ћелија.

Завршно поглавље **Литература**, садржи листу од 210 коришћених библиографских јединица, 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. Dragoj M, Bankovic J, Sereti E, Jovanovic Stojanov S, Dimas K, Pesic M, Stankovic T. Anti-invasive effects of CXCR4 and FAK inhibitors in non-small cell lung carcinomas with mutually inactivated p53 and PTEN tumor suppressors. Invest New Drugs. 2017; 35(6):718-732 (M21) <https://link.springer.com/article/10.1007/s10637-017-0494-4>
2. Dragoj M, Milosevic Z, Bankovic J, Tanic N, Pesic M, Stankovic T, Targeting CXCR4 and FAK reverses doxorubicin resistance and suppresses invasion in non-small cell lung carcinoma. Cell Oncol. 2017 40(1):47 - 62 (M21) <https://link.springer.com/article/10.1007/s13402-016-0304-6>

Б1. Радови у часописима домаћег значаја:

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја:

1. Miodrag Dragoj, Sonja Stojkovic Buric, Ana Podolski-Renic, Jelena Dinic, Marija Stepanovic, Milica Pesic, Tijana Stankovic, Inhibition of focal adhesion kinase and matrix metalloproteinase 2 and 9 affects the invasive properties of non-small cell lung carcinoma, The Third Congress of the SDIR - Challenges in anticancer research: translation of knowledge to improve diagnosis and treatment, Srpsko društvo istraživača raka, pp. 75 - 76, Belgrade, Serbia, 6. - 7. Oct, 2017 (M34)
2. Ana Podolski-Renic, Miodrag Dragoj, Sonja Stojkovic, Jelena Dinic, Jasna Bankovic, Evangelia Sereti, Sofija Jovanovic Stojanov, Konstantinos Dimas, Milica Пешић, Tijana Stankovic, Targeting CXCR4 and FAK in non-small cell lung carcinomas with co-inactivated p53 and PTEN tumor suppressors, ESMO 2017 Congress: Integrating science into oncology for a better patient outcome, Annals of Oncology, Oxford University Press, 28, 5, pp. 585 - 585, Madrid, Spain, 8. - 12. Sep, 2017 (M34)
3. Miodrag Dragoj, Jasna Bankovic, Ana Podolski-Renic, Jelena Dinic, Nikola Tanic, Milica Pesic, Tijana Stankovic, The effects of CXCR4 and FAK inhibitors on invasion inhibition in NSCLC cell lines with different functional status of p53 and PTEN., EACR Conference, Goodbye Flat Biology, EACR, pp. 17 - 17, Berlin, Nemačka, 2. - 5. Oct, 2016 (M34)
4. Miodrag Dragoj, Zorica Milošević, Jelena Dinić, Ana Podolski-Renić, Jasna Banković, Sonja Stojković, Nikola Tanić, Milica Pešić, Tijana Stanković, Reversal of doxorubicin resistance in non-small cell lung carcinoma cell lines by targeting CXCR4 receptor and focal adhesion

kinase, 3rd Workgroup Meeting COST ACTION CM1106, COST, pp. 89 - 89, Atina, Grčka, 26. - 27. Mar, 2015 (M34)

5. Miodrag Dragoj, Milosevic Zorica, Bankovic Jasna, Dinic Jelena, Podolski-Renic Ana, Stojkovic Sonja, Pesic Milica, Tanic Nikola, Stankovic Tijana, CCND1overexpression associate with KRAS and PTEN alterations in non-small cell lung carcinoma patients, 11th Balkan Congress of Human genetics, Društvo geneticara Srbije, pp. 21 - 21, Beograd, Srbija, 17. - 20. Sep, 2015 (M34)

6. Miodrag Dragoj, Zorica Milosevic, Jelena Dinic, Ana Podolski-Renic, Jasna Bankovic, Sonja Stojkovic, Nikola Tanic, Milica Pesic, Tijana Stankovic, The effects of CXCR4 and FAK inhibition on resistance reversal and suppression of invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines, The second congress of the Serbian Association for Cancer Research with international participation "Cancer research: perspectives and application, SDIR, pp. 98 - 98, Beograd, Srbija, 2. - 3. Oct, 2015 (M34)

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја:

1. Tijana Stankovic, Miodrag Dragoj, Zorica Milosevic, Jasna Bankovic, Jelena Dinic, Ana Podolski-Renic, Sonja Stojkovic, Nikola Tanic, Milica Pesic, Evaluation of CXCR4 receptor and FAK kinase as possible targets for non-small cell lung carcinoma treatment, Serbian Biochemical Society Fifth Conference - Integrated research in life science, Serbian Biochemical Society, pp. 51 - 60, Belgrade, Serbia, 13. - 13. Nov, 2015 (M63)

Мишљење и предлог Комисије:

Увидом у докторску дисертацију, као и објављене научне радове, Миодрага Д. Драгоја, Комисија са задовољством може истаћи да приказани резултати дају значајан научни допринос у области разумевања механизма метастазирања и развоја резистенције на терапију код неситноћелијског карцинома плућа, као и да отварају нове могућности за унапређење постојећих терапеутских приступа у лечењу овог тешког 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 Миодрагу Д. Драгоју јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Ефекти инхибиције CXCR4 рецептора и фокалне адхезионе киназе у супресији инвазије и превазилажењу резистенције код неситноћелијског карцинома плућа**”.

КОМИСИЈА:

др Горан Брајушковић, ванредни професор,
Универзитет у Београду- Биолошки факултет

др Тијана Станковић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду- Институт за биолошка
истраживања ”Синиша Станковић”

др Јелена Динић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду- Институт за биолошка
истраживања „Синиша Станковић“,

У Београду, _____ године.