

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На IV редовној седници одржаној **24. 01. 2020.** на основу молбе ментора, др Гордане Матић, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Владана Чокића, научног саветника Института за медицинска истраживања, Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Милоша С. Диклића**, истраживача сарадника Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду под насловом: „**Анализа експресије фактора инфламације S100A4, S100A8/9, S100A12 у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са мутацијом у ЈАК2 гену**“, у саставу:

1. др Владан Чокић, научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за медицинска истраживања
2. др Гордана Матић, редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет
3. др Оливера Митровић Ајтић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду - Институт за медицинска истраживања

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Милоша С. Диклића под називом: „Анализа експресије фактора инфламације S100A4, S100A8/9, S100A12 у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са мутацијом у ЈАК2 гену“ својом темом, циљевима, методолошким приступом, добијеним резултатима и њиховим тумачењем представља оригинални истраживачки допринос расветљавању улоге хроничне инфламације и инфламаторних фактора у процесу настанка и развоја мијелопролиферативних неоплазми.

Докторска дисертација је у потпуности урађена у Лабораторији за молекуларну онкологију Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, у оквиру пројекта основних истраживања (ОИ175053) под називом „Испитивање патогенезе хематолошких малигнитета“ финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Докторска дисертација под наведеним насловом је написана на 111 страна и садржи 7 поглавља, 65 графикона, 16 слика, 5 табела, 181 литературни податак и 3 прилога. На почетку дисертације приложени су подаци о члановима комисије за одбрану докторске дисертације, резиме на српском и апстракт на енглеском језику са кључним речима (без пагинације) и садржај. Пагинирани текст ове докторске дисертације састоји се од 7 поглавља и то: *Увод* (19 страна), *Циљеви* (1 страна), *Материјал и методе* (11 страна), *Резултати* (58 страна), *Дискусија* (5 страна), *Закључци* (1 стране) и *Литература* (13 страна). На крају дисертације приложена је Листа скраћеница, Биографија аутора, Изјава о

ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Предмет истраживања докторске дисертације Милоша Диклића јесте испитивање ефеката хроничне инфламације и инфламаторних фактора S100A4, S100A8/9 и S100A12 на настанак и развој мијелопролиферативних неоплазми (МПН), као и утицај присуства Јанус киназа 2 (JAK2) мутације на експресију ових фактора.

Поглавље **УВОД** је подељено на четири целине, у којима кандидат даје детаљан приказ података из литературе који се односе на проблематику докторске дисертације. У првом делу описане су основне карактеристике МПН – полицитемије вере (ПВ), есенцијалне тромбоцитемије (ЕТ) и примарне мијелофиброзе (ПМФ). У следећој целини описани су молекуларни маркери МПН, односно мутације у генима за JAK2, CALR и MPL и дат је детаљан опис JAK2 гена, као и JAK-STAT сигналног пута уз опис JAK2V617F мутације као покретачке мутације за класичне BCR-ABL1 негативне МПН. У наредној целини описана је инфламација као одговор организма на одређена патолошка стања и детаљно је представљена хронична инфламација која је присутна и код пацијената са МПН. У последњој целини увода представљени су S100 протеини, као регулатори метаболизма калцијума, који је неопходан за њихове бројне биолошке функције. Описана је структура ових протеина, њихово функционисање, као и посттранслационе модификације које су важне за регулацију њихове функције. Представљено је и њихово деловање, како на ћелијском, тако и ванћелијском нивоу. У оквиру ове целине описана је и улога S100 протеина у неопластичној трансформацији, метастазирању и апоптози, процесима који су од изузетног значаја за настанак и развој тумора. Поједини представници ове протеинске фамилије који су од највећег значаја за настанак и развој МПН детаљно су описани.

У поглављу **ЦИЉЕВИ** јасно је изнет општи циљ истраживања у оквиру ове дисертације који представља утврђивање дориноса мутације JAK2 гена и инфламаторних фактора у патогенези МПН. У оквиру основног општег циља, дефинисани су специфични циљеви:

- 1) одређивање степена присуства мутације JAK2 код свих МПН пацијената методом ДНК секвенцирања
- 2) анализа нивоа генске експресије и протеинског нивоа S100A4, S100A8, S100A9 и S100A12 фактора код МПН пацијената
- 3) испитивање утицаја IL-6, IL-10 и JAK инхибитора на ниво генске експресије и протеински ниво фактора инфламације на хуманој HEL 92.1.7 ћелијској линији
- 4) испитивање сигналних путева којима IL-6 и IL-10 остварују своје ефекте на ћелије периферне крви пацијената са МПН и HEL 92.1.7 ћелијској линији

У оквиру поглавља **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** детаљно су описани експериментални протоколи за сваки од циљева, као и методе које су коришћене у овом истраживању и начин обраде резултата, а навођени су и реагенси и уређаји који су коришћени у раду. Описане су методе изолације ћелија коришћених у раду, као и хумана HEL 92.1.7 ћелијска линија. Детаљно су описане методе детекције експресије гена (*RT-PCR* и *Q-RT-PCR*). и нивоа протеина (*Western blot*), анализе узорака костне сржи (имуноцитохемијско и имунохистохемијско обележавање), док је учешће специфичних

сигналних путева у деловању фактора од интереса испитивано применом одговарајућих фармаколошких инхибитора сигналних путева.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** кандидат систематично и на детаљан начин представља резултате својих истраживања. Поглавље је организовано у оквиру целина, а у складу са постављеним циљевима. Пре свега, представљени су резултати о основним обележјима испитаника са МПН, као и њиховом *JAK2* статусу. Добијени резултати су приказани на 65 графикона, допуњених пратећим текстуалним објашњењима. Одређени су нивои генске експресије *S100A* гена и нивои *S100A* протеина од интереса у гранулоцитима и моноклеарним ћелијама пацијената са МПН и ћелијској линији HEL 92.1.7 са мутацијом у *JAK2* гену. Резултати су показали да *S100A* фактори инфламације показују повећање нивоа, које зависи од присуства *JAK2V617F* мутације код појединачних протеина. На протеинском нивоу у гранулоцитима МПН, показано је статистички значајно повећање нивоа *S100A4*, код свих МПН, независно од статуса *JAK2V617F* мутације. У случају *S100A8* и *S100A9*, показано је статистички значајно повећање нивоа код ПВ пацијената (и хомозиготног и хетерозиготног стања), као и код ЕТ хетерозигота, а ови резултати су по први пут показали да су *S100A8* и *S100A9* повећани, уз друге инфламаторне маркере, у зависности од алелског оптерећења *JAK2V617F* мутацијом. Протеински нивои *S100A12* такође су били повећани у свим МПН, што указује да у костној сржи пацијената са МПН постоји хронична инфламација, будући да је овај протеин маркер системске инфламације.

Као циторедуктивна терапија код МПН примењује се хидроксиуреа, те је испитан антиинфламаторни утицај хидроксиуреа и комбинације хидроксиуреа и специфичног *JAK2* инхибитора на HEL 92.1.7 хуману ћелијску линију и показано је да доводи до значајног смањења нивоа испитиваних *S100* протеина, а као још значајније, да се они експримирају на *JAK2*- завистан начин у овој ћелијској линији.

У наставку приказани су резултати који се односе на испитивање утицаја IL-6, и IL-10 и фармаколошких инхибитора сигналних путева на експресију инфламаторних *S100* протеина. Добијени резултати показали су да је IL-6 генерално смањивао или није утицао на ниво *S100* протеина у моноклеарним ћелијама пацијената са МПН. Поред тога, показано је да је синтеза *S100A9* код ових ћелија зависна од *JAK1/2* и NF-κB сигналних путева. IL-6 је као проинфламаторни цитокин инхибирао NF-κB сигнализацију код ЕТ и ПМФ, док је инхибиција PI3K довела до смањења активности NF-κB код ЕТ. Инхибиција *JAK-STAT* сигналног пута неспецифичним инхибитором руксолитинибом активирала је NF-κB сигнални пут код ЕТ. Добијени резултати указују да је проинфламаторним цитокином изазвано генерално смањење нивоа *S100* протеина код МПН посредовано NF-κB и PI3K сигналним путевима.

Антиинфламаторни цитокин IL-10 такође је смањивао нивое *S100* протеина, поготово *S100A8* и *S100A9* код пацијената са ЕТ, али посредовано PI3K-АКТ сигналним путем. У IL-6 / IL-10 посредованој регулацији нивоа *S100* протеина код МПН доминирају NF-κB и PI3K сигнални путеви, док је активација *JAK-STAT* сигналног пута конститутивна.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидат је критички анализирао своје резултате које је на детаљан и свеобухватан начин повезао са резултатима сличних истраживања објављеним у међународним научним часописима. Ово поглавље подељено је на пет целина у оквиру којих су поступно тумачени резултати ове докторске дисертације у контексту постојећих литературних података. Такође, резултати истраживања непознати

научној литератури и показани по први пут анализирани су и објашњени на одговарајући начин.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** јасно су сумирани закључци изведени на основу добијених и дискутованих резултата а према претходно постављеним конкретним циљевима:

1. S100 протеини представљају важне биомаркере хроничне инфламације у МПН, будући да су укључени у активацију ћелијских рецептора и учествују у сигналним путевима.
2. Инфламација, анализирана преко нивоа фактора инфламације S100A4, S100A8, S100A9 и S100A12 показује повећање, које зависи од присуства JAK2V617F мутације код појединачних протеина. S100A4 повишен је код свих МПН, независно од присуства JAK2V617F мутације. S100A8 и S100A9 показују значајно повећање код ПВ пацијената са JAK2V617F мутацијом у хомозиготном и хетерозиготном стању, као и код ЕТ хетерозигота. Нивои S100A12 протеина такође су били повећани у свим МПН. Наведено повећање нивоа фактора инфламације указује да код оболелих од МПН постоји хронична инфламација.
3. Третман цитостатиком хидроксиуреом и комбинацијом хидроксиуреа и специфичног JAK2 инхибитора 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексаном смањује ниво фактора инфламације у HEL 92.1.7 ћелијској линији са JAK2V617F мутацијом. Снижење нивоа S100 протеина повезаних са инфламацијом указује да се испитивани S100 протеини експримирају на JAK2-зависан начин.
4. Проинфламаторни цитокин IL-6 смањивао је нивое S100A8 и S100A9 протеина у моноклеарима пацијената са ЕТ, што је посредовано NF-κB сигналним путем.
5. Антиинфламаторни цитокин IL-10 такође је смањивао нивое S100A8 и S100A9 протеина код пацијената са ЕТ, али посредовано PI3K-AKT сигналним путем.
6. NF-κB и PI3K сигнални путеви доминантни су у IL-6 / IL-10 посредованој регулацији нивоа S100 протеина код МПН, где је активација JAK-STAT сигналног пута конститутивна.
7. Инфламаторни цитокини негативном повратном спрегом регулишу S100A8 и S100A9 мијелоидне протеине који такође учествују у хроничном инфламаторном одговору код МПН.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** дата је опсежна листа научних публикација које су у складу са областима које су од значаја за урађену докторску дисертацију и адекватно и на одговарајућим местима су цитиране у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Diklić M**, Mitrović- Ajtić O, Subotički T, Djikić D, Kovačić M, Bjelica S, Beleslin-Čokić B, Tošić M, Leković D, Gotić M, Santibanez JF. IL6 inhibition of inflammatory S100A8/9 proteins is NF- κ B mediated in essential thrombocythemia. Cell Biochemistry and Function. 2019 Dec 29. (M23) <https://doi.org/10.1002/cbf.3482>
2. Kovačić M, Mitrović-Ajtić O, Beleslin-Čokić B, Djikić D, Subotički T, **Diklić M**, Leković D, Gotić M, Mossuz P, Čokić VP. TLR4 and RAGE conversely mediate pro-inflammatory S100A8/9-mediated inhibition of proliferation-linked signaling in myeloproliferative neoplasms. Cellular Oncology. 2018 Oct 1;41(5):541-53. (M21) <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0392-6>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Miloš Diklić**, Olivera Mitrović-Ajtić, Tijana Subotički, Dragoslava Djikić, Sunčica Bjelica, Milica Tošić, Juan F. Santibanez, Vladan P. Čokić. IL-6 stimulation of pro-inflammatory S100A mediators is NF- κ B supported in mononuclear cells of essential thrombocythemia. 14th MPN&MPNr-EuroNet Meeting 2019, Belgrade, Serbia, May 8-10, 2019, OPS6, Pp. 37 (Abstract book) (M34)
2. **Diklić M**, Buač M, Mitrović O, Beleslin-Čokić B, Subotički T, Djikić D, Čokić V. The S100 Proteins as Mediators of Inflammation Are Increased in Myeloproliferative Neoplasm and Downregulated by JAK2 Inhibition. HAEMATOLOGICA, (2016), vol. 101 br. Page 806-806. 21st Congress of the European Hematology Association. Stockholm, Sweden, 2016. (M34)
3. Mitrović O, Mossuz P, **Diklić M**, Šefer D, Ilić B, Peruničić M, Jovčić G, Čokić VP. Expression analysis of JAK-STAT dependent S100 calcium binding proteins A4 and A12 in myeloproliferative neoplasms. Haematologica 2013:98, Page 616 (B1550). 18th Congress of the European Hematology Association. Stockholm, Sweden. June 13-16, 2013 (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 „Анализа експресије фактора инфламације S100A4, S100A8/9, S100A12 у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутације у JAK2 гену“, аутора Милоша С. Диклића, констатовано је да утврђено подударње текста износи 16%. Овај степен подударности претежно је последица подударња имена и афилијација ментора и чланова Комисије; назива гена, протеина, биолошких врста, хемијских једињења; симбола којима се означавају гени и протеини; назива коришћених метода; појединих детаља стандардних експерименталних процедура, као што су састави инкубационих смеша, дужине и температуре инкубирања, брзине центрифугирања и сл; делова реченица који сами за себе немају смисао (нпр. „У ћелијама костне сржи МПН пацијената“, „значајно повећан код пацијената који су“ и сл.). Сматрамо да су све пронађене подударности прихватљиве и да ни на који начин не утичу на оригиналност ове докторске дисертације. Сматрамо да су све пронађене подударности прихватљиве и да ни на који начин не утичу на оригиналност докторске дисертације Милоша С. Диклића.

Мишљење и предлог Комисије

На основу прегледа докторске дисертације Милоша С. Диклића под насловом „Анализа експресије фактора инфламације S100A4, S100A8/9, S100A12 у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутације у JAK2 гену“ Комисија је мишљења да овај рад представља оригиналан и значајан научни допринос кандидата у области молекуларне биологије хематолошких малигнитета. По свом садржају и форми, добро написаном уводном делу, јасно постављеним истраживачким циљевима, добро осмишљеној методологији, прецизно изнетим резултатима рада, разложној дискусији и добро формулисаним закључцима ова докторска дисертација испуњава све критеријуме добро написаног научног рада.

Комисија је мишљења да докторске дисертације Милоша С. Диклића, својом темом, постављеним циљевима, методолошким приступом, добијеним резултатима и њиховим тумачењем представља оригинални истраживачки допринос разумевању хроничне инфламације код МПН.

Свеобухватна истраживања експресије, механизма деловања S100 протеина и сигналних путева укључених у настанак хроничне инфламације приказана у докторској дисертацији Милоша С. Диклића допринела су разумевању биологије МПН. Остварени резултати објављени су у оквиру два оригинална научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата.

На основу свега изложеног, као и чињенице да је кандидат Милош С. Диклић испунио све формалне услове за одбрану докторске дисертације под насловом „Анализа експресије фактора инфламације S100A4, S100A8/9, S100A12 у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутације у JAK2 гену“, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да усвоји извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Милоша С. Диклића.

КОМИСИЈА:

др Владан Чокић, научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за медицинска истраживања

др Гордана Матић, редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Оливера Митровић Ајтић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду - Институт за медицинска истраживања

У Београду, 09.03.2020.