

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 13.07.2020. године, на основу молбе ментора, Данијеле Максимовић-Иванић, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Дијане С. Драча**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, под насловом: **„Молекулски механизми деловања антитуморског агенса из групе синтетских тубулизина, тубуги 1, на одабраним модел системима меланома“**, у саставу:

1. др Данијела Максимовић-Иванић, научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Институт од националног значаја за Републику Србију
2. др Милица Маркелић, доцент, Универзитет у Београду-Биолошки факултет
3. др Сања Мијатовић, научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију
4. др Игор Голић, научни сарадник, Универзитет у Београду-Биолошки факултет

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Дијане С. Драча** под насловом **„Молекулски механизми деловања антитуморског агенса из групе синтетских тубулизина, тубуги 1, на одабраним модел системима меланома“** написана је на 84 страна и садржи 39 слика и 3 табеле. Ненумерисани део докторске дисертације обухвата: насловну страну на српском и енглеском језику, страницу са подацима о ментору и комисији за одбрану, изјаву захвалности, сажетак на српском и енглеском језику, листу скраћеница и садржај докторске дисертације, на почетку дисертације, док се на крају дисертације налазе: биографија аутора, изјава о ауторству, изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада као и изјава о коришћењу. Нумерисани део докторске дисертације (основни текст) подељен је у седам поглавља: **Увод** (12 страна), **Циљеви истраживања**

(1 страна), **Материјал и методе** (13 страна), **Резултати** (25 страна), **Дискусија** (9 страна), **Закључци** (1 страна) и **Литература** (15 страна). Поглавље **Литература** садржи 204 библиографске јединице.

Анализа докторске дисертације

Предмет ове докторске дисертације је био да се утврди ефикасност и расветле механизми деловања антитуморског агенса синтетисаног по узору на природне тубулизине, тубуги 1, на моделима мишјег и хуманог меланома *in vitro* и *in vivo*. Експериментални део рада у оквиру докторске дисертације урађен је на Одељењу за имунологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” – Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду. Експерименти који су укључивали рад на животињама су одобрени од стране Етичког комитета Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” (решење бр. 07-10/15).

Резултати истраживања које је кандидаткиња Дијана Драча приказала у овој дисертацији пружају сазнања о антитуморској активности тубуги 1 на модел системима који се користе у истраживању меланома. Студија је обухватила испитивање ефеката тубуги 1 на вијабилитет ћелијских линија мишјег и хуманог меланома. Такође је утврђивана селективност агенса према малигном фенотипу. У оквиру *in vitro* студије, проучавани су узрочници пада вијабилитета ћелија меланома (присуство различитих типова ћелијске смрти, застој у фази ћелијског циклуса и пролиферацији ћелија). Антитуморска активност синтетског аналога тубулизина, тубуги 1, испитана је *in vivo* на сингеном моделу солидног мишјег меланома и поређена са конвенционалним цитостатиком паклитакселом. Поред тога, процењиван је ефекат агенса на фагоцитни капацитет макрофага, њихов цитотоксични потенцијал и фенотипске карактеристике *ex vivo*. Детаљним изучавањем механизма деловања тубуги 1, у оквиру ове студије, показан је изванредан потенцијал тестираног агенса у третману меланома који се заснива не само на директним цитоцидним ефектима већ и на јачању антитуморског имунског одговора. Значај резултата ове дисертације, важан је управо са аспекта проналажења нових могућности у терапији меланома, с обзиром да постојећи терапеутски режими нису довољно ефикасни, као и да је инциденца меланома у сталном порасту.

Поглавље **УВОД** се састоји од четири потпоглавља. У првом потпоглављу су приказани поједини аспекти биологије меланоцита, ћелија које у кожи синтетишу меланин и чија неопластична трансформација доводи до настанка меланома. У другом потпоглављу описани су узроци настанка као и савремене терапије меланома. У последња два потпоглавља фокус је на микротубулама, као потенцијалној терапеутској мети у малигној ћелији и на агенсима који своје антитуморско деловање остварују утицајем на њихову организацију.

Посебна пажња је посвећена тубулизинима (секундарним метаболитима миксобактерија) и првом синтетском аналогу ових једињења – тубуги 1.

У оквиру поглавља **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** кандидаткиња полази од познатих података научних истраживања која показују да тубулизини у великој мери инхибирају вијабилитет туморских ћелија *in vitro* и сходно томе, супримирају раст тумора *in vivo*, али и чињенице да синтетски аналог тубулизина, тубуги 1, није довољно окарактерисан у светлу антитуморске активности. У складу са наведеним, постављени су следећи циљеви:

1. да се утврди утицај тубуги 1 на вијабилитет ћелијских линија меланома В16 пореклом из миша и А-375, пореклом од човека *in vitro*;
2. да се дефинишу молекулски механизми директног деловања тубуги 1 на ћелије меланома;
3. да се испита антитуморски потенцијал тубуги 1 *in vivo* на моделу мишјег солидног меланома;
4. да се испита утицај тубуги 1 на цитотоксичну активност и фенотипске карактеристике макрофага *in vitro* и *ex vivo*.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** је написано јасно и прецизно. Побројани су коришћени реагенси, укључујући и њихове произвођаче, а потом и раствори. Затим су наведене ћелијске линије и експерименталне животиње коришћене у студији, уз опис метода за изолацију примарних ћелија. Детаљно су описане методе трипсинизације, одређивања броја и вијабилитета ћелија. Објашњена је микроскопска анализа морфологије нуклеуса. Потом су наведени флуоресцентни обележивачи који су употребљени у сврху дефинисања могућих узрока пада вијабилитета ћелија методом проточне цитофлуориметрије и флуоресцентне спектроскопије. Следи приказ метода за одређивање параметара оксидативног стреса у ћелији, укључујући садржај тиолних група, глутатиона и малондиалдехида. Затим је описана имуноблот метода за анализу нивоа експресије протеина. Детаљно су описане методе микроскопске анализе фагоцитозе *in vitro*. У склопу *in vivo* студије приказана је метода индукције тумора у С57ВL/6 мишевима, детаљан опис третмана мишева синтетским аналогом тубулизина, тубуги 1, и паклитакселом, као и методе анализе параметара токсичности примењених третмана. Даље, приказане су методе за функцијску и фенотипску карактеризацију макрофага изолованих из жртвованих животиња, укључујући флуориметрију и проточну цитофлуориметрију. На крају, наведени су и статистички тестови који су коришћени за анализу добијених података.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ**, кандидаткиња је јасно и прегледно приказала резултате својих истраживања у оквиру 15 потпоглавља. Свако потпоглавље садржи опис конкретног предмета истраживања уз навођење примењених метода, опис резултата као и конкретне закључке. Ова потпоглавља су јасно логички повезана и читаоцу је лако да прати ток истраживања. У првом потпоглављу кандидаткиња представља резултате који

се тичу утицаја синтетског аналога тубулизина, тубуги 1, на вијабилитет ћелија меланома, примарних ћелија миша и трансформисане мишје линије фибробласта. Такође, приказују се резултати утицаја паклитаксела, конвенционалног цитостатика, на вијабилитет ћелијских линија меланома, ради поређења са активношћу тестираног агенса. Показано је да тубуги 1 селективно инхибира раст ћелијских линија меланома. У другом потпоглављу је приказан утицај синтетског аналога тубулизина на дистрибуцију ћелија меланома по фазама ћелијског циклуса и њихов пролиферативни потенцијал. Добијени резултати су показали да тубуги 1 инхибира пролиферацију и доводи до застоја у прогресији ћелијског циклуса. Следећа четири потпоглавља приказују резултате који се односе на механизам покренут у одговору В16 ћелија на присуство тубуги 1, укључујући утицај експерименталног агенса на индукцију апоптозе и експресију протеина релевантних за наведени процес, на активацију каспаза и продукцију реактивних врста кисеоника и азота. Уочено је да испитивани агенс индукује атипичну апоптозу коју карактерише одсуство екстернализације фосфатидилсерина. Наредно потпоглавље је посвећено резултатима који описују фагоцитозу апоптотских ћелија након третмана тубуги 1 од стране макрофага *in vitro*. Овај резултат је показао да, упркос изостанку екстернализације фосфатидилсерина, овакве ћелије бивају препознате и неометано фагоцитоване од стране макрофага. Затим, следећа два потпоглавља описују ефекат тубуги 1 у смањивању раста меланома *in vivo*, као и на појаву знакова опште токсичности код третираних животиња. Третман животиња тубуги 1 је значајно смањио раст меланома без видљивих знакова токсичности. У следећем потпоглављу, приказан је утицај тубуги 1 на фагоцитни и цитотоксични капацитет, као и на фенотипске одлике макрофага *ex vivo*. Макрофаги из животиња третираних тубуги 1 су показали изразити цитотоксични потенцијал као и фенотипске маркере М1 фенотипа. Последњих пет потпоглавља описују резултате који се односе на механизам покренут код А-375 ћелија у одговору на присуство тубуги 1. Међу њима, описан је утицај овог агенса на индукцију митотске катастрофе, апоптозе и аутофагије, на активацију каспаза, експресију медијатора ових процеса, као и протеина сигналних путева кључних за деобу и смрт малигне ћелије. Ови резултати најбоље илуструју могућност конверзије једног у други тип ћелијске смрти, тј. митотске катастрофе у апоптозу. Такође, показано је да тестирани агенс за мету деловања има р70S6 киназу и S6 протеин, што, у складу са њиховом примарном улогом у регулацији пролиферације, синтезе протеина као и аутофагије, јасно објашњава претходно описане резултате.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** добијени резултати су на критички начин анализирани и тумачени у контексту досадашњих података из литературе који су у вези са предметом истраживања ове дисертације. На почетку су елабориране природне супстанце као потенцијални антитуморски агенси, са фокусом на оне чија је мета митотско вретено, попут тубулизина. Следи кратак осврт на досадашња сазнања о антитуморској активности тубуги 1, агенса синтетисаног по узору на класу једињења изузетног антитуморског потенцијала, тубулизине, а затим су изнесени и дискутовани остварени резултати његовог

утицаја на вијабилитет ћелија меланома, као и примарних ћелија. Истакнута је висока селективност агенса према малигном фенотипу. Потом следи анализа добијених резултата на B16 ћелијској линији, са акцентом на уоченој атипичној апоптози која је индукована тестираним агенсом. Наиме, у експерименту је показана апоптоза која није праћена екстернализацијом фосфатидилсерина. У тексту су дискутовани могући узроци и утицај овог феномена на ефикасност процеса фагоцитозе у живом систему. У наставку је разматран утицај тубуги 1 на раст мишијег меланома *in vivo*, као и на појаву параметара опште токсичности у поменутом моделу. Посебно је полемисано о позитивном утицају експерименталног агенса на фагоцитну способност макрофага, као и на цитотоксични потенцијал и фенотипске одлике ових ћелија изолованих из животиња приликом жртвовања. Акцент је стављен на успостављање проинфламаторног M1 фенотипа макрофага изолованих из животиња третираних агенсом. То је доведено у везу са изостанком екстернализације фосфатидилсерина на мембрани апоптотских ћелија меланома, с обзиром да екстернализација фосфатидилсерина фаворизује антиинфламаторни M2 фенотип. Ови резултати постављају темељ новом концепту у терапији канцера који подразумева блокаду екстернализације фосфатидилсерина. Дискусија се даље наставља у правцу разматрања значаја евалуације активности експерименталног агенса на високо инвазивној A-375 ћелијској линији. Детаљно су продискутовани резултати добијени на овим ћелијама, односно молекулски механизми покренути код A-375 ћелија у одговору на тубуги 1. Занимљиво, третман тубуги 1 је код ових ћелија покренуо сложену интеракцију митотске катастрофе, аутофагије и апоптозе, упућујући на чињеницу да је реч о агенсу чији је механизам деловања условљен специфичношћу ћелијске линије. Велика пажња је посвећена анализи утицаја тубуги 1 на експресију протеина релевантних за поменуте процесе. У завршном делу дискусије разматра се утицај тубуги 1 на промену експресије протеина сигналних путева укључених у регулацију ћелијске смрти и деобе и довођење у везу ових промена са претходно поменутиим процесима. На крају, поглавље се завршава критичким освртом на предности које би примена тубуги 1 у терапији меланома пружила у односу на тренутно доступне хемотерапеутике.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** су систематично сумирани најважнији закључци изведени у складу са предметом докторске дисертације и према претходно постављеним циљевима, а формиран на основу добијених резултата и конкретне дискусије. Утврђено је да тубуги 1 супримира раст линија меланома *in vitro*, али и да је високо селективан за малигни фенотип. Он индукује атипичну апоптозу B16 ћелија без екстернализације фосфатидилсерина, за шта је највероватније одговоран изостанак оксидације мембранских липида. На A-375 ћелијској линији тубуги 1 покреће комплексну интеракцију митотске катастрофе, аутофагије и апоптозе. Потврђен је и ефекат овог агенса у супресији раста меланома *in vivo*. Тубуги 1 не компромитује фагоцитозу, стимулише цитотоксични

потенцијал макрофага и њихову поларизацију ка М1 фенотипу *ex vivo*, указујући на оснаживање антитуморског имунског одговора.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 204 библиографске јединице. Литературни извори су актуелни као и релевантни по избору и броју, правилно су, и на одговарајућим местима наведени у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Драча D, Mijatović S, Krajnović T, Pristov JB, Đukić T, Kaluđerović GN, Wessjohann LA, Maksimović-Ivanić D. The synthetic tubulysin derivative, tubugi-1, improves the innate immune response by macrophage polarization in addition to its direct cytotoxic effects in a murine melanoma model. *Exp Cell Res.* 2019; 380 (2): 159-170. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.04.028>

M22

Линк ка публикацији:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014482719302125?via%3Dihub>

2. Драча D, Mijatović S, Krajnović T, Kaluđerović GN, Wessjohann LA, Maksimović-Ivanić D. Synthetic tubulysin derivative, tubugi-1, against invasive melanoma cells: the cell death triangle. *Anticancer Res.* 2019; 39 (10): 5403-5415. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13734>

M23

Линк ка публикацији:

<http://ar.iiarjournals.org/content/39/10/5403.long>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Dijana Драча, Sanja Mijatović, Tamara Krajnović, Goran N. Kaluđerović, Ludger A. Wessjohann, Danijela Maksimović-Ivanić. Synthetic tubulysin, tubugi 1, induced mitotic catastrophe in the A-375 melanoma cells. Fourth International Congress CHALLENGES IN REDOX BIOLOGY (SSMFRP-2018). September 28-30, 2018; Belgrade, Serbia. Book of Abstracts p61.

M34

2. Dijana Драча, Goran N. Kaluđerović, Tamara Krajnović, Ludger A. Wessjohann, Sanja Mijatović, Danijela Maksimović-Ivanić. Tubugi induced phosphatidylserine-independent apoptosis of B16 melanoma cells. The 3rd Congress of the Serbian Association for Cancer Research (SDIR). October 6-7, 2017; Belgrade, Serbia. Book of Abstracts p60-61.

M34

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Dijana Drača**, Goran N. Kaluđerović, Tamara Krajnović, Ludger A. Wessjohann, Sanja Mijatović, Danijela Maksimović-Ivanić. Novi aspekti delovanja *N*-supstituisanog peptida tipa tubulizina - tubugi u modelu mišjeg melanoma. Svetski dan imunologije. April 27, 2017; Beograd, Srbija. **M64**
2. **Dijana Drača**, Goran N. Kaluđerović, Ludger A. Wessjohann, Sanja Mijatović, Danijela Maksimović-Ivanić. Efekat sintetičkog derivata peptida tipa tubulizina – tubugi na ćelije melanoma B16 i A375. VII Naučni sastanak Društva imunologa Srbije. April 27-28, 2016; Beograd, Srbija. **M64**

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње **Дијане С. Драча, Б3056/2013**, подвргнута је софтверској провери оригиналности 13.05.2020. год. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 13.05.2020. год.

Резултати електронске провере ове докторске дисертације показују да индекс подударности износи 12%. Овај степен подударности последица је навођења личних имена, општих појмова, нашироко коришћених синтагми, назива ћелијских линија, назива реагенаса, скраћеница, коришћења стандардних израза из области истраживања, коришћења кратких фраза уобичајених у датој области претходно публикованих резултата докторанткињих истраживања, који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника. Наведена преклапања краћих делова појединих различитих реченица нису повезана и не чине смислену целину. Подударности са наведеним изворима у највећем броју случајева износе мање од 1%.

С обзиром на наведено, а у складу са чланом 8 став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Дијане С. Драча** под насловом „Молекулски механизми деловања антитуморског агенса из групе синтетских тубулизина, тубуги 1, на одабраним модел системима меланома“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидаткиње **Дијане С. Драча**, под насловом „**Молекулски механизми деловања антитуморског агенса из групе синтетских тубулизина, тубуги 1, на одабраним модел системима меланома**“, представља оригиналан научни рад у области биологије канцера. Изузетну вредност овој докторској дисертацији даје резултат да, поред директног туморицидног деловања, тубуги 1 активира макрофаге и потенцира неспецифични антитуморски имунски одговор. Посебан значај има веза између фагоцитозе апоптотских ћелија независне од екстернализације фосфатидилсерина и успостављања цитотоксичног фенотипа макрофага. Наведени резултати ове дисертације могу имати фундаментални значај у формирању савремених приступа у лечењу малигних болести. Резултати истраживања ове дисертације су објављени у међународним часописима у оквиру два оригинална научна рада у којима је Дијана С. Драча први аутор.

Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени у потпуности и да добијени резултати имају велики значај у области биологије тумора. Имајући у виду квалитет и допринос ове докторске дисертације Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и одобри кандидаткињи **Дијани С. Драча** јавну одбрану докторске дисертације под називом „**Молекулски механизми деловања антитуморског агенса из групе синтетских тубулизина, тубуги 1, на одабраним модел системима меланома**”.

КОМИСИЈА:

У Београду, 24.07.2020. године

Др Данијела Максимовић-Иванић, научни саветник
Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Институт од националног значаја за Републику Србију

Др Милица Маркелић, доцент
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

Др Сања Мијатовић, научни саветник
Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Институт од националног значаја за Републику Србију

Др Игор Голић, научни сарадник
Универзитет у Београду-Биолошки факултет