

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На Х редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 10.09.2021. године, прихваћен је извештај ментора проф. др Надежде Недељковић и др Јелене Динић о урађеној докторској дисертацији Марије Д. Нешовић (рођ. Степановић), истраживача сарадника на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, под насловом „Улога инхибитора Src тирозин-киназе у превазилажењу урођено резистентног и инвазивног фенотипа глиобластома“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у следећем саставу:

1. проф. др Надежда Недељковић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду
2. др Јелена Динић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду
3. др Милица Пешић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду
4. др Александра Дивац Ранков, виши научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду
5. др Марија Ацић, научни сарадник Биолошког факултета Универзитета у Београду

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Марије Д. Нешовић (рођ. Степановић) под насловом „Улога инхибитора Src тирозин-киназе у превазилажењу урођено резистентног и инвазивног фенотипа глиобластома“ је оригинално истраживање из области молекуларне онкологије, са фокусом на циљану терапију глиобластома. Експериментални део ове докторске дисертације урађен је на Одељењу за неуробиологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду под непосредним руководством др Јелене Динић, вишег научног сарадника, уз финансијску подршку Министарства за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије (кандидаткиња је учествовала као истраживач сарадник на институционалном пројекту евиденциони бр. 451-03-68/2020-14/200007 и 451-03-9/2021-14/200007 и пројекту ИИИ41031 „Идентификација молекуларних маркера за предикцију прогресије тумора, одговора на терапију и исхода болести“).

Докторска дисертација садржи 84 стране. Пагинирани текст докторске дисертације чине следећа поглавља: **Увод** (19 страна), **Циљеви рада** (2 стране), **Материјал и методе** (12 страна), **Резултати** (23 стране), **Дискусија** (7 страна), **Закључци** (2 стране) и **Литература** (19 страна). Дисертација садржи 27 слика (6 у поглављу Увод и 21 у поглављу Резултати) и 3 табеле у поглављу Резултати. У поглављу Литература је цитирано 243 библиографских јединица. Дисертација садржи и уобичајене уводне (непагиниране) стране са неопходним

информацијама о докторској дисертацији: Насловну страну на српском и енглеском језику, Информације о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Сажетак на српском и енглеском језику, Листу скраћеница и Садржај. На крају дисертације су приложена следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

Тема ове докторске дисертације је из области молекуларне онкологије, а ужа научна област је канцерогенеза. Предмет истраживања ове дисертације је циљана терапија глиобластома, пре свега утицај инхибитора Срц тирозин-киназе на инвазивне карактеристике глиобластома и превазилажење њихове урођене резистенције на терапију.

У поглављу **Увод**, кандидаткиња кроз четири потпоглавља даје сажет преглед података из научне литературе који се односе на проблематику докторске дисертације. У првом потпоглављу кандидаткиња нас најпре упознаје са општим одликама тумора, као и процесима који леже у основи туморогенезе. Кроз друго потпоглавље кандидаткиња даје преглед актуелне терапије малигнух тумора, као и приказ нових терапеутских приступа који укључују циљану терапију малигнух тумора. Посебан осврт је дат на тирозин-киназе као мете циљане терапије. Представљени су релевантни инхибитори тирозин-киназа који су нашли примену у циљаној терапији малигнух тумора и описана је интеракција инхибитора тирозин-киназа са АБЦ транспортерима, укључујући и П-гликопротеин. На крају овог потпоглавља, наглашен је потенцијал инхибиције Срц тирозин-киназе у лечењу малигнух тумора. Након тога, у трећем потпоглављу кандидаткиња описује глиобластома и карактеристике које доводе до њихове инвазивности и резистенције на актуелну терапију, са освртом на улоге Срц тирозин-киназе и АБЦ транспортера у настанку инвазивног и резистентног фенотипа. На крају, у четвртном потпоглављу описана је циљана терапија глиобластома која наглашава употребу инхибитора тирозин-киназа, а посебно инхибитора Срц тирозин-киназе у лечењу овог типа малигног тумора.

На основу представљених литературних података, у поглављу **Циљеви** дефинисан је основни научни циљ ове докторске дисертације, а то је испитивање потенцијала инхибитора Срц тирозин-киназе, Si306 и његовог пролека pro-Si306, на смањење инвазивности и резистенције на лекове ћелија глиобластома.

Главни циљ је подељен на специфичне циљеве који обухватају:

1. Испитивање утицаја инхибитора Срц тирозин-киназе, Si306 и pro-Si306 на инвазивност хуманих ћелијских линија U87 и U87-TxR, и примарних култура хуманог глиобластома *ин vitro*.
2. Испитивање утицаја инхибитора Срц тирозин-киназе, Si306 и pro-Si306, на експресију и активност компоненти Срц сигналног пута у ћелијама глиобластома *ин vitro*.
3. Испитивање утицаја инхибитора Срц тирозин-киназе, Si306 и pro-Si306, на инвазивност ћелија глиобластома *ин vivo* у ксенографт моделу U87 ћелија у ембрионима зебрице.
4. Испитивање утицаја инхибитора Срц тирозин-киназе, Si306 и pro-Si306, на функцију и експресију П-гликопротеина *ин vitro* у U87-TxR ћелијској линији глиобластома са вишеструком резистенцијом на лекове.

5. Испитивање потенцијала инхибитора Срц тирозин-киназе, Si306 и pro-Si306, за превазилажење резистенције на хемиотерапеутик паклитаксел код U87-TxR ћелијске линије глиобластома *ин vitro*.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** детаљно су описане све фазе експерименталног рада. У почетном делу описане су ћелијске линије глиобластома (U87 и U87-TxR) коришћене у изради ове дисертације, начин и услови њиховог гајења, као и успостављање примарних култура глиобластома од узорака ткива пацијената са глиобластомом градуса IV прикупљених на Клиници за неурохирургију, Клиничког центра Србије. Представљена је имуноцитохемијска метода којом су окарактерисане три примарне културе глиобластома (GBM-4, GBM-5 и GBM-6) даље коришћене у експерименталном раду. Затим су детаљно описани појединачни и комбиновани третмани терапеутицима (инхибитори Срц тирозин-киназе, темозоломид, паклитаксел) примењивани на ћелијским линијама и примарним културама глиобластома, као и МТТ тест вијабилности коришћен за одређивање цитотоксичности испитиваних једињења на поменутиим ћелијама. Представљена је и метода проточне цитофлуориметрије коришћена за испитивање експресије П-гликопротеина, Срц тирозин-киназе и њене активне фосфорилисане форме у ћелијама глиобластома. Детаљно су описане и процедуре изолације иРНК и протеина, метода квантитативног PCR-а коришћена за анализу нивоа експресије испитиваних гена (*MDP1*, *ММП2* и *ММП9*) и „Western blot“ метода коришћена за анализу нивоа експресије укупних протеина и њихових фосфорилисаних форми (Срц, ФАК, ЕГФР, ЕРК и АКТ). За испитивање инвазивног потенцијала ћелија *ин vitro* коришћена су и детаљно описана два теста: тест деградације желатина и тест инвазије. Описана је и методологија уз помоћ које је успостављен ксенографт модел U87 ћелија у ембрионима зебрице са циљем одређивања инвазивног потенцијала ове ћелијске линије *ин vivo*, као и праћења ефеката инхибитора Срц тирозин-киназе на инвазивност инокулисаних ћелија. У завршном делу овог поглавља описане су одговарајуће статистичке методе коришћене за обраду добијених података.

У поглављу **Резултати** детаљно су наведени подаци добијени у истраживању и јасно су представљени уз одговарајуће илустративне и табеларне приказе и пратеће статистичке анализе. Представљање резултата започиње описом карактеристика хуманих примарних култура глиобластома. Након тога је приказан ефекат инхибитора Срц тирозин-киназе, Si306 и pro-Si306, и референтних једињења дасатиниба и темозоломида на вијабилност хуманих ћелијских линија и примарних култура коришћених у експерименталном делу ове дисертације. Значајан ефекат Si306 и pro-Si306 на ћелијски раст глиобластома добијен је у микромоларном опсегу концентрација 1-20 μM . Показана је и зависност (негативна корелација) осетљивости глиобластома на инхибиторе Срц тирозин-киназе и нивоа експресије саме Срц тирозин-киназе у овим ћелијама. Даље је установљено да је инвазивни капацитет, испитан на ћелијским линијама и примарним културама глиобластома, најнижи код вишеструко-резистентне ћелијске линије U87-TxR, а највиши код примарних култура GBM-4 и GBM-5. Такође, показана је повезаност инвазивних карактеристика које испољавају ћелије глиобластома са експресијом матриксних металопротеиназа, пре свега ММП-2. Третман инхибиторима Срц тирозин-киназе смањивао је експресију *ММП2* у U87 ћелијама. Испитивана једињења, Si306 и pro-Si306, значајно су умањила способност обе ћелијске линије и примарних култура глиобластома да разграде ванћелијски матрикс у тесту деградације желатина, и смањила способност U87 и U87-TxR да прођу базалну мембрану у тесту инвазивности ћелија. Резултати су такође указали да је смањење инвазивног потенцијала ћелија глиобластома овим инхибиторима независно од њиховог инхерентног инвазивног потенцијала. *Ин vivo*, Si306 и pro-Si306 су спречили инвадирање U87 ћелија у ксенографт моделу ембриона зебрице. Оба инхибитора Срц тирозин-киназе су такође смањила експресију и активност компоненти Срц сигналног пута ћелија глиобластома *ин vitro*. На крају је показан потенцијал Si306 и pro-Si306 за инхибицију активности П-гликопротеина код U87-TxR ћелија са прекомерном експресијом овог АБЦ транспортера.

Такође, примена Si306 или pro-Si306 повећала је ефикасност паклитаксела код поменутих ћелија. Утицај испитиваних инхибитора Срц тирозин-киназе на функцију П-гликопротеина није праћен променама у његовој генској и протеинској експресији, што ове супстанце квалификује и као потентне инхибиторе П-гликопротеина.

У оквиру поглавља **Дискусија** кандидаткиња је дала 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 утицај испитиваних инхибитора Срц тирозин-киназе Si306 и pro-Si306 на вијабилност U87, U87-TxR, GBM-4, GBM-5 и GBM-6 ћелија у односу на референтна једињења већ примењена у терапији глиобластома. Такође, пажња је усмерена и на утицај количине циљног молекула, Срц тирозин-киназе, на уочену резистенцију примарних култура глиобластома на испитиване инхибиторе. Даље, кандидаткиња је посебну пажњу обратила на дискутовање дејства инхибитора Срц тирозин-киназе на смањење инвазивног потенцијала ћелија глиобластома *in vitro*. Поред тога, *in vivo* ксенографт модел ембриона зебрице омогућио је потврду резултата добијених *in vitro*, применом инхибитора Срц тирозин-киназе у концентрацији знатно нижој од примењених у *in vitro* експериментима. Посебно је наглашен значај ксенографт модела U87 ћелија у ембрионима зебрица, успостављеног и окарактерисаног у оквиру ове докторске дисертације, за будућа *in vivo* истраживања анти-инвазивног и анти-пролиферативног потенцијала циљаних терапеутика и других потенцијалних анти-туморских агенаса. Даље је тумачено дејство Si306 и pro-Si306 на Срц-посредовану сигнализацију и повезаност смањене активности Срц тирозин-киназе и чланова њеног сигналног пута са смањеном инвазивношћу ћелија глиобластома. На крају је дискутована способност Si306 и pro-Si306 да модулишу вишеструко-резистентан фенотип ћелија глиобластома која се огледа кроз њихов утицај на активност П-гликопротеина, као и могућности ових једињења да доведу до реверзије резистенције на хемиотерапију код ћелија глиобластома. Такође, дискутована су и ограничења овог истраживања и истакнут је његов могући клинички значај.

У поглављу **Закључци**, кандидаткиња је изнела концизне закључке који су проистекли из резултата истраживања:

1. Инхибитори Срц тирозин-киназе смањују инвазивност ћелија глиобластома.
 - Осетљивост ћелија глиобластома на испитиване инхибиторе Срц тирозин-киназе, Si306 и pro-Si306, је пропорционална експресији саме Срц тирозин-киназе.
 - Смањење инвазивног потенцијала ћелија глиобластома инхибиторима Срц тирозин-киназе, Si306 и pro-Si306, је независно од њиховог инхерентног инвазивног потенцијала.
 - Инхибитори Срц тирозин-киназе, Si306 и pro-Si306, смањују инвазивни потенцијал ћелија глиобластома *in vivo*.
 - Инхибиција инвазивног потенцијала ћелија глиобластома применом Si306 и pro-Si306 је последица инхибиције активности усходних и нисходних чланова Срц тирозин-киназног сигналног пута.
2. Инхибитори Срц тирозин-киназе показују потенцијал за превазилажење резистенције ћелија глиобластома.
 - Дејство Si306 и pro-Si306 на вијабилност ћелија глиобластома није под утицајем вишеструке резистенције на лекове коју испољавају U87-TxR ћелије глиобластома.
 - Инхибитори Срц тирозин-киназе смањују активност П-гликопротеина и доводе до реверзије резистенције U87-TxR ћелија на хемиотерапеутик паклитаксел.

Завршно поглавље **Литература**, садржи листу од 243 библиографских јединица, од којих је велики број најновијег датума (објављених у последњих 5 година). Референце су адекватно наведене, покривају све аспекте ове докторске дисертације и цитиране су на одговарајућим местима у тексту.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. Nešović M, Divac Rankov A, Podolski-Renić A, Nikolić I, Tasić G, Mancini A, Schenone S, Pešić M, Dinić J. Src Inhibitors Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines, Si306 and Pro-Si306, Inhibit Focal Adhesion Kinase and Suppress Human Glioblastoma Invasion In Vitro and In Vivo. *Cancers (Basel)*. 2020 Jun 14;12(6):1570. doi: 10.3390/cancers12061570.
<https://www.mdpi.com/2072-6694/12/6/1570> **M21**
2. Fallacara AL, Zamperini C, Podolski-Renić A, Dinić J, Stanković T, Stepanović M, Mancini A, Rango E, Iovenitti G, Molinari A, Bugli F, Sanguinetti M, Torelli R, Martini M, Maccari L, Valoti M, Dreassi E, Botta M, Pešić M, Schenone S. A New Strategy for Glioblastoma Treatment: In Vitro and In Vivo Preclinical Characterization of Si306, a Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidine Dual Src/P-Glycoprotein Inhibitor. *Cancers (Basel)*. 2019 Jun 19;11(6):848. doi: 10.3390/cancers11060848.
<https://www.mdpi.com/2072-6694/11/6/848> **M21**

Б2. Радови у часописима домаћег значаја:

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја:

1. Nešović M, Podolski-Renić A, Stanković T, Divac Rankov A, Nikolić I, Tasić G, Botta M, Pešić M, Dinić J. c-Src inhibitors pyrazolo[3,4-d]pyrimidines, Si306 and pro-Si306, evade multidrug resistant phenotype and suppress invasion in glioblastoma. 4th Congress of the SDIR: Bringing science to oncology practice: Where is Serbia? Belgrade, Serbia, October 3-5, 2019. p. 46. **M34**
2. Stepanović M, Podolski-Renić A, Stanković T, Divac Rankov A, Fallacara AL, Schenone S, Botta M, Pešić M, Dinić J. The potential of c-Src inhibitors Si306 and pro-Si306 for suppressing invasion and overcoming multidrug resistance in glioblastoma. COST Action CM1407 Meeting dedicated to Early Career Investigators, Brussels, Belgium, February 18-19, 2019. p. 9. **M34**
3. Dinić J, Stepanović M, Divac Rankov A, Podolski-Renić A, Stanković T, Dragoj M, Jovanović M, Lazić K, Dimas K, Botta M, Pešić M. Evaluation of anticancer compounds activity and toxicity in zebrafish model. COST Action CA17104 STRATAGEM 1st Working Group Meeting WG1 - WG4, Turin, Italy, January 30-31, 2019. p. 34. **M34**
4. Dinić J, Podolski-Renić A, Stanković T, Stojković Burić S, Dragoj M, **M34**

Stepanović M, Pešić M. Zebrafish as a tool for in vivo studies on human cancer. The Third Congress of the SDIR - Challenges in anticancer research: translation of knowledge to improve diagnosis and treatment, Belgrade, Serbia, October 6-7, 2017. p. 25.

5. Stankovic T, Podolski-Renic A, Dinic J, Stojkovic Buric S, Dragoj M, **M34** Stepanovic M, Pesic M. Pharmacological inhibition as targeted approach to suppress cancer invasion and overcome chemoresistance. The Third Congress of the SDIR - Challenges in anticancer research: translation of knowledge to improve diagnosis and treatment, Belgrade, Serbia, October 6-7, 2017. p. 24.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја:

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 „Улога инхибитора Src тирозинкиназе у превазилажењу урођено резистентног и инвазивног фенотипа глиобластома“, кандидаткиње Марије Д. Нешовић (рођ. Степановић), утврђено је подударане текста које износи 17% уз искључена преклапања цитата и библиографских података о коришћеној литератури. Овај степен подударности условљен је преклапањем општих места и података (попут елемената садржаја, листе скраћеница, назива институција), општих научних термина, стандардних лабораторијских протокола, претходно публикованих резултата докторандових истраживања који су проистекли из ове дисертације што је у складу са чланом 9. Правилника.

Мишљење и предлог Комисије:

Увидом у докторску дисертацију, као и објављене научне радове Марије Д. Нешовић (рођ. Степановић), Комисија сматра да је студија заснована на савременим сазнањима, те адекватно и прецизно спроведена. Добијени резултати су јасно представљени, добро и критички продискутовани уз опсежне литературне податке.

Резултати истраживања ове докторске дисертације публиковани су у 2 рада у међународном часопису од високог значаја („Cancers“ - категорија M21; импакт фактор 6.126 (2019) и 6.639 (2020)). Треба истаћи да је прва публикација остварена у сарадњи са „LDS - Lead Discovery Siena S.r.l.“, фармацеутском/биотехнолошком компанијом са посебним фокусом на циљане терапеутике у онкологији која је носилац патента за једињења испитана у оквиру ове дисертације. Иако кандидаткиња није први аутор на овој публикацији услед сарадње са истраживачима поменуте компаније, допринос њеног истраживања овом раду је обиман и кључан што се огледа и у наслову публикације који наглашава један од главних резултата ове докторске дисертације. Такође, треба напоменути да обе публикације имају отворени приступ што не само да задовољава захтеве Платформе отворене науке Министарства просвете, науке и технолошког развоја, већ истовремено директно утиче на њихову већу видљивост и цитираност. Резултати овог истраживања су такође презентовани у форми саопштења на 5 међународних научних скупова. Кандидаткиња је добитник Прве награде за постер презентацију на Четвртом конгресу Српског друштва истраживача рака под покровитељством Европског друштва истраживача рака одржаног октобра 2019. године у Београду, на којем су презентовани главни налази ове докторске студије.

Узимајући у обзир горе наведено, Комисија са задовољством може истаћи да приказани резултати дају значајан научни допринос у области разумевања механизма инвазивности и резистенције глиобластома, 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 кандидаткиње, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију и предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри Марији Д. Нешовић (рођ. Степановић) јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Улога инхибитора Src тирозин-киназе у превазилажењу урођено резистентног и инвазивног фенотипа глиобластома”.

КОМИСИЈА:

др Надежда Недељковић, редовни професор,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Јелена Динић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић” -
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Милица Пешић, научни саветник,
Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић” -
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Александра Дивац Ранков, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

др Марија Ацић, научни сарадник,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

У Београду, _____ године.