

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На IV редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 25.01.2019. године, прихваћен је извештај ментора др Оливере Митровић Ајтић и др Маје Чакић-Милошевић о урађеној докторској дисертацији **Тијане М. Суботички**, истраживача сарадника Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, под насловом „**Анализа експресије eNOS и ангиогених фактора HIF-1 $\alpha$  и VEGF у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутација у генима за JAK2 и CALR**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Оливера Митровић Ајтић, научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања, др Маја Чакић-Милошевић, доцент, Универзитет у Београду-Биолошки факултет и др Владан Чокић, научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију и Већу подноси следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**Општи подаци о докторској дисертацији:**

Докторска дисертација **Тијане М. Суботички**, под насловом „**Анализа експресије eNOS и ангиогених фактора HIF-1 $\alpha$  и VEGF у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутација у генима за JAK2 и CALR**“, урађена је у Институту за медицинска истраживања у Београду у оквиру пројекта под бројем ОИ 175053 “Испитивање патогенезе хематолошких малигнитета” финансираног од стране Министарства за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије.

Докторска дисертација је написана на 178 страна куцаног текста и подељена је у седам поглавља: Увод (30 страна), Циљеви истраживања (2 стране), Материјал и методе (18 страна), Резултати (84 стране), Дискусија (18 страна), Закључци (3 стране) и Литература (20 страна). Дисертација садржи: 77 графикона, 13 табела и 47 слика.

У дисертацији је цитирано 179 библиографских јединица. Докторска дисертација садржи и податке о менторима и члану комисије, сажетак на српском и енглеском језику, садржај, биографију аутора и потписане изјаве.

**Анализа докторске дисертације:**

У поглављу **УВОД**, кандидаткиња је у оквиру шест целина дала детаљан приказ података из литературе који се односе на проблематику докторске дисертације, у складу са циљем и постављеним задацима. У првом потпоглављу детаљно је описан процес хематопоезе, са посебним освртом на CD34<sup>+</sup> ћелије, које имају висок пролиферативни капацитет и могу да се диференцирају у све ћелије хематопоетске линије.

У следећем потпоглављу описане су основне карактеристике мијелопролиферативних неоплазми (МПН) – полицитемије вере (ПВ), есенцијалне тромбоцитемије (ЕТ) и примарне мијелофиброзе (ПМФ), као и морфологија костне сржи код пацијената са МПН.

У трећем потпоглављу, детаљно је описан процес ангиогенезе, при чему су истакнути фактори који учествују у њеној регулацији – васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF), хипоксија-индуцибилни фактор алфа (HIF-1 $\alpha$ ), као и ензим ендотелне азот оксид синтетазе

(eNOS). Посебно је описана улога Wnt/ $\beta$ -катенин сигналног пута, PPAR $\gamma$  фактора, као и макрофага у регулацији процеса ангиогенезе.

У следећем потпоглављу детаљно је описана Јанус киназа 2 (JAK2), као и JAK-STAT сигнални пут и његова улога у процесу ангиогенезе, са посебним освртом на улогу проинфламаторног IL-6 у активацији JAK фамилије киназа. Такође, описана је и улога PI3K/Akt и MAPK сигналних путева у процесу ангиогенезе, као и мутација у гену за калретикулин (CALR).

У петом потпоглављу описано је циторедуктивно лечење код МПН пацијената, са посебним освртом на хидроксиуреју која се користи као хемиотерапеутски лек у лечењу МПН.

У последњем потпоглављу представљени су такође и JAK инхибитори, пре свега руксолитиниб, као неспецифични JAK инхибитор који је 2011. године одобрен за лечење оболелих од мијелофиброзе, који не реагују на терапију хидроксиурејом. Такође, описан је и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан, специфични JAK2 инхибитор, као веома потентан инхибитор аутофосфорилације JAK2.

У поглављу **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** кандидаткиња поставља следеће циљеве истраживања: код оболелих од МПН утврдити учесталост JAK2V617F мутације, као и мутације у гену за CALR; анализирати степен експресије ангиогених фактора HIF-1 $\alpha$ , VEGF и eNOS у гранулоцитима и CD34<sup>+</sup> ћелијама, као и костној сржи оболелих; испитати степен експресије ангиогених фактора после најмање шест месеци терапије хидроксиурејом; испитати степен експресије  $\beta$ -катенина, PPAR $\gamma$  и Ki67 протеина у костној сржи оболелих и упоредити са њеном ултраструктурном грађом. Такође, испитати степен пролиферације и апоптозе гранулоцита МПН пацијената *in vitro*, у одговору на проинфламаторни IL-6 и JAK инхибиторе; испитати утицај IL-6 на степен експресије ангиогених фактора на моделу хумане HEL 92.1.7. ћелијске линије са JAK2 мутацијом и диференцираних макрофага, као и степен њихове експресије након третмана са хидроксиурејом и JAK инхибиторима, као и да се анализира учешће различитих сигналних путева (JAK2/STAT3, PI3K/Akt, MAPK), којима IL-6 остварује своје ефекте, на моделу хумане HEL 92.1.7. ћелијске линије, диференцираних макрофага и гранулоцита МПН пацијената.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** дати су подаци о коришћеном биолошком материјалу и реагенсима. Представљен је експериментални дизајн како би се објаснила поставка експерименталних задатака. Описане су методе изолације ћелија коришћених у раду, као и хумане HEL 92.1.7 ћелијска линија. Детаљно су описане методе детекције експресије протеина и гена, метод ултраструктурне анализе узорака костне сржи, као и метод проточне цитометрије за анализу ћелијског циклуса. На крају, кандидаткиња представља и статистичке методе (GraphPad Prism програм, REST програм) коришћене при обради добијених резултата.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** организовано је у оквиру целина, а у складу са постављеним циљевима. Пре свега, представљени су резултати о основним обележјима испитаника са МПН, као и њиховом JAK2 и CALR мутационом статусу. Након тога представљени су резултати генске и протеинске експресије ангиогених фактора у односу на присуство мутација. Добијени резултати су показали да је ангиогенеза повећана код свих МПН пацијената, зависна од присуства JAK2V617F код ПМФ или мутације у гену за CALR код ЕТ. Утврђено је да је експресија сва три фактора повећана у гранулоцитима и CD34<sup>+</sup> ћелијама, што указује на значај инфламаторних гранулоцита у развоју ангиогенезе. Такође, показано је да стандардно лечење применом хидроксиуреје код МПН пацијената има антиангиогени потенцијал у смислу смањења сва три ангиогена фактора у гранулоцитима.

Показано је да образац експресије  $\beta$ -катенина може имати значајну улогу у тромбозама ПВ и ЕТ пацијената, као и да Wnt/ $\beta$ -катенин сигнални пут може имати значајну ангиогену улогу у патогенези ПМФ. Такође добијени резултати су показали да Wnt/ $\beta$ -катенин сигнални

пут инхибира експресију PPAR $\gamma$ , као и да циљање овог сигналног пута може представљати ефикасан приступ за лечење ПМФ. Поред тога је показано да је пролиферативни индекс значајно већи код пацијената са ПМФ, у односу на пацијенте са ПВ и ЕТ дијагнозом, што указује да пацијенти са овом дијагнозом имају најтежи ток болести.

У наставку приказани су резултати који се односе на испитивање утицаја IL-6 и JAK1/2 инхибитора на експресију ангиогених фактора у HEL ћелијама и диференцираним макрофагима. Показано је да JAK1/2 инхибитори блокирају IL-6 стимулацију експресије HIF-1 $\alpha$ , али не и експресију VEGF, у HEL ћелијама и макрофагима, док JAK2 инхибитор смањује IL-6 стимулацију експресије eNOS фактора. Ови резултати показују да је повећање експресије HIF-1 $\alpha$  посредовано JAK1/2 путем, а eNOS само преко JAK2 пута.

У последњој целини приказани су резултати испитивања утицаја IL-6 и JAK1/2 инхибитора на активацију сигналних путева, као и ћелијски циклус у гранулоцитима МПН пацијената и HEL ћелијама. Резултати су показали да IL-6 активација JAK2/STAT3 и PI3K/Akt сигнализације континуирано расте у гранулоцитима пацијената са ПВ и ПМФ дијагнозом, док је активирање MAPK сигнализације са IL-6 континуирано повећано само у гранулоцитима пацијената са ПВ дијагнозом. Поред тога, резултати су показали да присуство JAK2V617F мутације значајно повећава активацију JAK2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигнализације у гранулоцитима пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом. Такође, неспецифична JAK1/2 инхибиција снажно стимулише MAPK сигнализацију у гранулоцитима пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом, за разлику од специфичне JAK2 инхибиције. Резултати су показали и да IL-6 зауставља гранулоците МПН пацијената у S фази ћелијског циклуса, стимулишући репликацију ДНК и спречавајући апоптозу, преко JAK1/2 стимулације.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидаткиња критички разматра приказане резултате поредећи их са подацима других аутора. Дискусија је организована у складу са представљеним резултатима и даје одговоре на питања постављена у циљевима. У првом делу су дискутоване опште карактеристике анализираних групе МПН болесника, као и степен заступљености мутација у генима за JAK2 и CALR. Након тога, кандидат прелази на дискутовање експресије ангиогених фактора у односу на присуство ове две мутације. Након тога следи дискусија о експресији  $\beta$ -катенина и PPAR $\gamma$  фактора са освртом на њихову улогу у процесу ангиогенезе, као и степен пролиферације у костној сржи МПН пацијената. У даљем тексту дискутовани су резултати који се односе на ефекат хидроксиуреје на експресију ангиогених фактора, као и ефекат IL-6 и JAK1/2 инхибитора на ћелијски циклус и активацију JAK2/STAT3, MAPK и PI3K/Akt сигналних путева у гранулоцитима МПН пацијената и HEL ћелијској линији.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** кандидаткиња на јасан начин изводи закључке који у потпуности произлазе из добијених резултата, а одговарају на постављене циљеве ове докторске дисертације. Са једне стране изведени су закључци који се односе на степен експресије ангиогених фактора код МПН пацијената у односу на присуство мутација у генима за JAK2 и CALR, утицај хидроксиуреје на њихову експресију, као и степен експресије  $\beta$ -катенина и PPAR $\gamma$  фактора и њихова веза са ангиогенезом. Са друге стране представљени су закључци који се односе на сигналне путеве путем којих IL-6 и JAK1/2 инхибитори остварују своје деловање у гранулоцитима МПН пацијената и HEL ћелијама. Као главне закључке кандидаткиња наводи да су фактори ангиогенезе, стимулирани инфламацијом, повећани код МПН пацијената и да се смањују применом хемиотерапије, као и да инфламација стимулише ДНК репликацију и JAK1/2 зависну пролиферацију, карактеристично повећану код МПН.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи списак 179 цитираних библиографских јединица. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Радови у часописима међународног значаја:

1. **Subotički T**, Mitrović Ajtić O, Beleslin-Čokić BB, Nienhold R, Diklić M, Đikić D, Leković D, Bulat T, Marković D, Gotić M, Noguchi CT, Schechter AN, Skoda RC, Čokić VP. Angiogenic factors are increased in circulating granulocytes and CD34<sup>+</sup> cells of myeloproliferative neoplasms. *Molecular Carcinogenesis*. 2017; 56(4): 567-579. (M21).  
(<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mc.22517>)
2. **Subotički T**, Mitrović Ajtić O, Mičić M, Kravić-Stevović T, Đikić D, Diklić M, Leković D, Gotić M, Čokić VP.  $\beta$ -catenin and PPAR- $\gamma$  levels in bone marrow of myeloproliferative neoplasm: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Ultrastructural Pathology*. 2018;42(6):498-507. (M23).  
(<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01913123.2018.1558323?journalCode=iusp20>)
3. **Subotički T**, Mitrović Ajtić O, Beleslin-Čokić BB, Bjelica S, Đikić D, Diklić M, Leković D, Gotić M, Santibanez JF, Noguchi CT, Čokić VP. IL-6 stimulation of DNA replication is JAK1/2 mediated in cross-talk with hyperactivated ERK1/2 signaling. *Cell Biology International*. 2019; 43(2): 192-206. (M23)  
(<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbin.11084>)

Конгресна саопштења са међународних скупова штампана у изводу:

1. **Subotički T**, Beleslin-Čokić B, Mitrović O, Diklić M, Marković D, Leković D, Šefer D, Gotić M, Čokić V. Hypoxic and non-hypoxic proangiogenic stimuli in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* **2014**:99, Page 661. 19th Congress of the European Hematology Association. Milan, Italy. June 12-15, 2014. (M34)
2. **Subotički T**, Beleslin-Čokić B, Leković D, Mojsilović S, Mitrović Ajtić O, Kovačić M, Diklić M, Gotić M, Čokić VP. Proinflammatory cytokine IL-6 stimulation of angiogenic factors and DNA replication is blocked by JAK-STAT pathway inhibition in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* **2017**:102 (Suppl. 2), Pages: 540-541 (E1319). 22nd Congress of the European Hematology Association. Madrid, Spain. June 22-25, 2017. (M34).
3. **Subotički T**, Beleslin-Čokić B, Đikić D, Mojsilović S, Šefer D, Bjelica S, Santibanez JF, Čokić VP. The inhibition of JAK/STAT signaling is compensated by activation of MAPK pathway in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* **2017**:102 (Suppl. 2), Pages: 536-537 (E1308). 22nd Congress of the European Hematology Association. Madrid, Spain. June 22-25, 2017. (M34).

Конгресна саопштења са домаћих скупова:

1. **Subotički T**, Mitrović Ajtić O, Mičić M, Kravić-Stevović T, Đikić D, Diklić M, Leković D, Gotić M, Čokić VP. Proliferation and differentiation in bone marrow of myeloproliferative neoplasm. Poster Presentation delivered at the 3rd Congress of the Serbian Association for Cancer Research (SDIR) with international participation. October 6-7, **2017**. Belgrade, Serbia. (M62).

## Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација **Тијане М. Суботички**, под насловом „**Анализа експресије eNOS и ангиогених фактора HIF-1 $\alpha$  и VEGF у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутација у генима за JAK2 и CALR**“, представља студију из области хематологије. С обзиром на актуелност поља истраживања, ова дисертација на концизан и јасан начин пружа увид у најновија сазнања из области, а резултатима и произашлим закључцима отвара питања од значаја за клиничку примену.

Комисија је мишљења да докторске дисертације **Тијане М. Суботички**, својом темом, постављеним циљевима, методолошким приступом, добијеним резултатима и њиховим тумачењем представља оригинални истраживачки допринос разумевању ангиогенезе код мијелопролиферативних неоплазми као и значаја хемиотерапије за смањење фактора ангиогенезе стимулираних инфламацијом.

Имајући у виду све напред наведено, као и да су резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације објављени у врхунском међународном часопису М21 категорије, као и међународним часописима М23 категорије, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Тијани М. Суботички** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Анализа експресије eNOS и ангиогених фактора HIF-1 $\alpha$  и VEGF у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутација у генима за JAK2 и CALR**“.

**КОМИСИЈА:**

---

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

---

Др Маја Чакић-Милошевић, доцент,  
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

---

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

У Београду, 06.02.2019. године.