

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj dana 09.07.2020. godine, broj 9700/09-AP imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Uloga adenozin-monofosfatom aktivirane protein-kinaze i mTOR kompleksa 1 u
in vitro citotoksičnom dejstvu nesteroidnih anti-inflamatornih lekova na ćelije
glioma“**

kandidata dr Aleksandra Pantovića, specijaliste neurologije zaposlenog na Klinici za neurologiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Mentor za izradu doktorske disertacije je prof. dr Vladimir Trajković a komentor je n. sar. dr Mihajlo Bošnjak.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. **Prof. dr Aleksandra Isaković**, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. **Prof. dr Ivanka Marković**, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. **Prof. dr Evica Dinčić**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta odbrane u Beogradu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Aleksandra Pantovića pod nazivom „Uloga adenozin-monofosfatom aktivirane protein-kinaze i mTOR kompleksa 1 u *in vitro* citotoksičnom dejstvu nesteroidnih anti-inflamatornih lekova na ćelije glioma“ napisana je na 90 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati,

diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 19 slika i 3 sheme, korišćena literatura sadrži spisak od 203 reference.

Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji. Struktura rada u celini sadrži sve elemente i zadovoljava sve kriterijume doktorske disertacije.

U **uvodu** kandidat dr Aleksandar Pantović iznosi podatke o primarnom tumorima centralnog nervnog sistema gliomima sa posebnim osvrtom na najčešći maligni tumor centralnog nervnog sistema glioblastom. Navedene su osnovne epidemiološke i kliničke karakteristike, teorije o poreklu ćelije glioblastoma i pregled postojećih terapijskih mogućnosti. U uvodnom delu navedeni su podaci o dokazima za antitumorsko delovanje nesteroidnih anti-inflamatornih lekova (NSAIL). Kandidat u uvodnom delu citira i osnovne neurofarmakološke karakteristike nesteroidnog anti-inflamatornog leka indometacina, koji je u istraživanju pokazao najizraženiji citotoksični efekat i jedini od ispitivanih lekova uticao na aktivaciju AMPK. Opisana je uloga signalnog puta AMPK/mTOR i model mTORC1- zavisne inhibicije AKT mehanizmima povratne sprege. Takođe opisan je molekularni mehanizam apoptoze, programirane ćelijske smrti tipa I i autofagije, kataboličkog procesa koji omogućuje ćelijsku degradaciju sopstvenih proteina i organela u autofagolizozomima.

Imajući u vidu ulogu AMPK u inhibiciji mTOR i indukciji apoptoze i autofagije, **pretpostavljeno** je da bi NSAIL svoje antigliomsko delovanje ostvaruju modulacijom AMPK/mTORC1 signalnog puta. Da bi ova pretpostavka bila ispitana postavljeni su sledeći **ciljevi** ovog istraživanja: (1) ispitati uticaj NSAIL na vijabilitet ćelija humane ćelijske linije glioma U251 i primarnih tumorskih ćelija izolovanih iz uzoraka tkiva pacijenata obolelih od glioblastoma (2) ispitati tip i mehanizme ćelijske smrti indukovane NSAIL u ćelijama glioma (3) ispitati uticaj NSAIL na aktivaciju AMPK/mTOR signalnog puta u ćelijama glioma (4) ispitati ulogu AMPK/mTOR signalnog puta u indukciji ćelijske smrti indukovane NSAIL u ćelijama glioma.

U poglavlju **materijal i metode**, kandidat detaljno opisuje eksperimentalne metode i uslove pod kojima su eksperimenti izvedeni:

(a) Gajenje humane ćelijske linije glioblastoma U251 kao i izolaciju primarnih tumorskih ćelija izolovanih iz uzoraka tkiva pacijenata obolelih od glioma gradusa IV. Na Klinici za neurohirurgiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu postavljena je

dijagnoza osnovnog oboljenja i uzeti su uzorci tkiva za izolaciju primarne kulture. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom Deklaracijom i odobreno od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Svi oboleli su dali pristanak u pisanoj formi za učešće u istraživanju i analizu uzoraka u dijagnostičke i naučne svrhe. Poglavlje materijal i metode je podeljeno u sledeće celine:

(b) Određivanje vijabiliteta ćelija merenjem aktivnosti ćelijskog enzima laktat dehidrogenaze, merenjem aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza i kristal violet testom.

(e) Ispitivanje uloge AMPK/mTORC1 signalnog puta u citotoksičnoj aktivnosti tretiranih ćelija merenjem vijabilnosti ćelija kod kojih je ekspresija AMPK inhibirana RNK interferencijom, kao i nakon tretmana ćelija aktivatorom mTORC1 leucinom. Takođe, u cilju dokazivanja uloge AMPK/mTORC1 signalnog puta ispitivano je da li farmakološki aktivatori AMPK metformin i AICAR poput indometacina ostvaruju antigliomske efekte modulacijom ovog signalnog puta.

(f) Utvrđivanje tipa i mehanizama ćelijske smrti. Za ovu svrhu korišćena je protočna citofluorimetrija za analizu apoptotske fragmentacije DNK, translokacije fosfatidilserina, aktivacije kaspaza, produkcije superoksida, promene potencijala mitohondrijalne membrane, acidifikacije ćelijske citoplazme. *Real-time* RT-PCR metoda je korišćena za analizu ekspresije inhibitora ciklin zavisne kinaze p21. Imunoblot metoda za ispitivanje ekspresije ili aktivacije signalnih molekula koji učestvuju u regulaciji energetske homeostaze, ćelijske proliferacije, apoptoze i autofagije (AMPK α , ACC, Akt, Raptor, mTOR, S6K, PRAS40, kaspazu-3, PARP, LC3, beclin-1).

(g) Utvrđivanje mehanizama ativacije AMPK. Sadržaj AMP i ATP u ćelijama linije U251 je analiziran gradijentnom tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC) i bioluminiscentnim esejem.

(h) Statističke metode korišćene za obradu dobijenih podataka.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

U poglavlju **diskusija** kandidat je na sistematičan način uporedio rezultate prikazane u ovoj doktorskoj disertaciji sa rezultatima drugih istraživača. Na osnovu

toga, kandidat je izneo svoje zaključke i hipoteze, koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije u skladu sa rezultatima većine drugih autora koji su imali isto istraživačko interesovanje.

U poglavlju **zaključci** su sumirani svi rezultati dobijeni u ovoj disertaciji, koji u potpunosti odgovaraju na ciljeve postavljene na početku izrade teze.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U poglavlju **rezultati** kandidat jasno i dokumentovano prikazuje dobijene eksperimentalne podatke o antigliomskom efektu NSAIL na ćelije glioma U251 linije i primarne kulture ćelija glioma gradusa IV (glioblastoma).

Prvi rezultati eksperimenata su pokazali da indometacin snažnije od drugih COX inhibitora, diklofenaka, naproksena i ketoprofena, smanjuje vijabilitet U251 ćelija humanog glioblastoma. Takođe u istraživanju kandidata pokazano je da jedino indometacin od korišćenih nesteroidnih anti-inflamatornih lekova statistički značajano aktivira AMPK. Tretman indometacinom koji je nadalje korišćen u istraživanju doveo je do morfoloških promena na ćelijama U251 linije koje su karakteristične za apoptozu. U ćelijama tretiranim indometacinom pokazane su promene u stepenu produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta, depolarizaciji mitohondrija, translokaciji fosfatidilserina na površini ćelijske membrane, DNK fragmentaciji, aktivaciji kaspaza i PARP. Citotoksičnom efektu indometacina prethodilo je povećanje ekspresije tumor supresorskog proteina p21 i zastoj ćelijskog ciklusa u G₂M fazi. Prikazni rezultati direktno dovode u vezu ulogu signalnog puta AMPK/mTORC1 sa antigliomskim delovanjem indometacina. Naime, pokazano je da indometacin povećava fosforilaciju AMPK i nishodnih molekula koje enzim fosforiliše kao što su Raptor-a i acetyl-CoA karboksilaze (ACC). Aktivaciju AMPK prati smanjenje fosforilacije mTOR i molekula čiju aktivnost mTORC1 reguliše, kao što su ribozomalna p70S6 kinaza (S6K) i PRAS40 (Ser183). Genetska inhibicija ekspresije AMPK molekula RNK interferencijom, kao i tretman ćelija aktivatorom mTORC1 leucinom dovde do delimičnog poništavanja citotoksičnih efekata izazvanih indometacinom. Sa druge strane, tretiranje U251 ćelija inhibitorom mTOR-a rapamicinom smanjuje broj živih ćelija u kulturi. Osim toga, farmakološki aktivatori AMPK metformin i AICAR poput indometacina ispoljavaju

antigliomski efekat inhibicijom mTORC1. Istražujući mehanizme kojima indometacin aktivira AMPK izmereno je smanjenje ćelijskog ATP i porast AMP/ATP odnosa u tretiranim ćelijama dok povezanost fosforilacije AMPK sa inhibicijom COX i povećanjem intraćelijskog nivoa kalcijuma nije nađena.

Rezultati pokazuju da je citotoksični efekat indometacina na ćelije primarne kulture glioblastoma takođe posredovan aktivacijom AMPK/Raptor/ACC i inhibicijom mTORC1/S6K signalnih molekula.

Konačno, istraživana je i sposobnost indometacina da indukuje autofagiju u ćelijskoj liniji glioblastoma U251. Međutim, nije detektovano povećanje markera autofagije kao što povećanje citoplazmatskih vezikula sa kiselim sadržajem, ekspresija beklina-1 i konverzija lakog lanca 3-I (LC3-I) u autofagozomnu formu LC3-II u prisustvu lizosomalnih inhibitora. Pokazano je da genetska i farmakološka inhibicija autofagije ne utiču na citotoksični efekat indometacina, što je potvrdilo da je antigliomski efekat leka nezavisan od autofagije.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati kandidata su sistematično upoređeni sa podacima iz literature. Poređenje rezultata sa rezultatima ranijih istraživanja ukazuje da su prikazani rezultati delimično u saglasnosti sa dosadašnjim istraživanjima, sa jasnim isticanjem novih saznanja u vezi sa istraživačkim ciljevima koji definišu i molekularne mehanizme ispitivanih lekova.

U ovoj disertaciji je utvrđeno da najveći stepen citotoksičnosti na ćelije glioma ispoljava indometacin. U nekoliko istraživanja prethodno je pokazano da indometacin smanjuje vijabilitet ćelija glioma *in vitro* (Amin i sar., 2003; Bernardi i sar., 2013; Bernardi i sar., 2009; Bernardi i sar., 2006). U studiji Leidgensa i saradnika (Leidgens i sar., 2015), diklofenak je takođe citotoksično delovao na ćelije glioma, pri čemu je $IC_{50} = 100 \mu M$ bila manja od IC_{50} vrednosti dobijenih u prikazanom istraživanju, što je kandidat diskutovao višestruko dužim periodom inkubacije u navedenoj publikaciji (u danima). Sa druge strane, ketoprofen je blago smanjivao rast sferoida, odnosno proliferaciju gliomskih ćelija u istraživanju Gatija i saradnika (Gati i sar., 1990).

Takođe, ostali ispitivani NSAID (diklofen, ketonal, naproksen) za razliku od indometacina nisu aktivirali AMPK/mTORC1 signalni put. U ovoj disertaciji pokazano je po prvi put da indometacin aktivira AMPK i nishodne molekule Raptor i ACC što autor koristi da u nastavku prvenstveno istražuje efekte i mehanizam delovanja ovoga leka iz grupe korišćenih NSAID.

Uočeno je da indometacin inicira zastoj u G₂M fazi ćelijskog ciklusa i dovodi do povećanja ekspresije tumor-supresorskog proteina p21. Navode se i drugi istraživači koji su pokazali da indometacin može izazvati zastoj ćelijskog ciklusa u ćelijama glioma u G₂/M i G₀/G₁ fazi (Bernardi i sar., 2006). Osim toga, u modelu u kojem su ćelije glioma U138-MG tretirane indometacinom vezanim za lipidno jezgro u nanokapsulama takođe je došlo do zastoja u ćelijskom ciklusu u G₂/M i u G₀/G₁ fazi. U istom istraživanju pokazano je da navedeni blok ćelijskog ciklusa prethodi apoptozi (Bernardi i sar., 2013).

Pokazano je da indometacin aktivira depolarizaciju mitohondrijalne membrane, povećava aktivnost kaspaze 3 i 9 i dovodi do eksternalizacije fosfatidil-serina i DNK fragmentacije. Morfološke i molekularne promene detektovane u ćelijama ukazale su da indometacin indukuje apoptozu u gliomskim ćelijama. Proapoptosko delovanje indometacina na ćelije glioma je prethodno pokazano u svega nekoliko publikacija. Bernardi i saradnici su pokazali da indometacin indukuje apoptozu nezavisno od inhibicije COX. U pomenutom istraživanju apoptoza izazvana indometacinom bila je inhibirana farmakološkim inhibitorima proto-onkogene c-Src kinaze, protein fosfataze-2A (PP2A) i mitogen aktivirane protein kinaze MEK (Bernardi i sar., 2006). U drugom istraživanju apoptozu indukovanu indometacinom u ćelijama glioma pratile su promene u sintezi ceramida, defosforilaciji Akt, ekspresiji Bax gena i aktivaciji kaspaze 3 (Chang i sar., 2018).

Pored dokazanog dejstva indometacina na aktivaciju AMPK, doprinos ove disertacije je u potvrdi uloge AMPK u antitumorskom dejstvu indometacina. Jeon i Hay predlažu da je za preživljavanje tumorskih ćelija neophodna precizna regulacija AMPK, te da i njena inhibicija i preterana aktivacija mogu biti toksične (Jeon i sar., 2015). U skladu sa tim, indometacin je indukovao snažnu i postojanu aktivaciju AMPK (u prvih 8 sati), kako u U251 ćelijama tako i u gliomskim ćelijama izolovanim iz pacijenata. Pored dokazane antitumorske uloge na brojnim tumorskim ćelijskim linijama i animalnim

modelima bolesti, objavljeno je i nekoliko publikacija koje dovode u vezu aktivaciju AMPK sa inhibicijom proliferacije i citotoksičnim efektom na ćelije glioma *in vitro* i *in vivo* (Isakovic i sar., 2007; Lee i sar., 2012; Liu i sar., 2014; Stupp i sar., 2012; Zhao i sar., 2017).

U disertaciji je pokazano da smanjenje fosforilacije mTORC1 i nishodnih molekula S6K i PRAS40 vremenski sledi aktivaciju AMPK, što ukazuje da je efekat na proliferaciju bar delimično posledica inhibicije mTOR. Slično navedenom efektu u ovom istraživanju, pokazano je da indometacin i nimesulid u ćelijama kolorektalnog karcinoma mogu smanjuju rast tumora i indukuju apoptozu inhibicijom mTOR (Zhang i sar., 2011). Rapamycin i njegovi analozi temsirolimus, everolimus i deforolimus su mTOR inhibitori koji su pokazali izvestan stepen antiproliferativne i antitumorske aktivnosti pri pojedinačnoj upotrebi *in vitro* (Yuan i sar., 2009). Međutim, dometi dosadašnjih kliničkih studija na obolelima od globlastoma u terapijskom smislu su veoma skromni, pored ograničenih radioloških promena u smislu smanjenja zapremine tumora, ove supstance nisu uticale na dužinu životnog veka lečenih (Geoerger i sar., 2012; Wang i sar., 2015).

Kandidat je prikazao rezultate koji ukazuju da indometacin aktivira Akt nakon 4 i 8 h, dok je nakon 16 h došlo do smanjenja njegove aktivnosti. Poredeći rezultate promenljive kinetike aktivnosti Akt pokazane u ovoj studiji na U251 ćelijama, indometacin je u dva istraživanja kontinuirano smanjivao fosforilaciju Akt u H4 i U87, odnosno C6 i U138-MG gliomskim ćelijama (Bernardi i sar., 2013; Chang i sar., 2018). Autor diskutuje da imajući u vidu da mTORC1 u određenim okolnostima inhibira mTORC2 (Sparks i sar., 2010), postoji mogućnost da je indometacin preko inhibicije mTORC1 doveo do reaktivacije mTORC2 i sledstvene stimulacije Akt. Dalje navodi da se porast fosforilacije Akt u prisustvu rapamicina takođe podudara sa ranije pokazanim rezultatima u kojima je inhibicija mTOR dovela do kompenzatorne aktivacije Akt zbog gubitka povratne sprege (Sparks i sar., 2010). Akt aktivira mTORC1 preko fosforilacije PRAS40 na Thr246 i/ili preko negativne regulacije TSC koji inhibira mTOR stimulator RHEB (Huang i sar., 2009; Sancak i sar., 2007). Rezultati pokazali su da je aktivacija Akt u četvrtom i osmom satu nakon tretmana praćena delimičnom reaktivacijom mTORC1 u šesnaestom satu. Međutim, stimulatorno dejstvo Akt nije uspelo da nadjača inhibicioni efekat AMPK, tako da je nivo fosforilisane forme mTOR i dalje bio niži

nego u kontroli. Takođe, fosforilacija Akt i PRAS40 (Thr24) se smanjuje u šesnaestom satu inkubacije indometacinom, što sugeriše da kasno smanjenje aktivnosti Akt može doprineti održavanju inhibicije mTORC1.

Kandidat poredeći rezultate citira grupu Dina i saradnika koja je pokazala da AMPK aktivacija acetilsalicilnom kiselinom suprimira mTOR u ćelijama kolorektalnog karcinoma, što je u ovom istraživanju bio osnovni mehanizam antitumorskog dejstva ovog leka (Din i sar., 2012). U istom istraživanju mTOR inhibicija acetilsalicilnom kiselinom indukovala je autofagiju u ćelijama kolorektalnog karcinoma. Autofagija je takođe bila indukovana u ćelijama kolorektalnog karcinoma tretiranim NSAIL celekoksibom i sulindak sulfidom (Bauvy i sar., 2001; Huang i sar., 2010), dok je za celekoksib pokazano i da indukuje autofagiju u ćelijama glioma (Kang i sar., 2009). Međutim, indometacinom indukovana mTORC1 supresija i citotoksičnost prema ovom istraživanju nisu bili povezani sa aktiviranjem procesa autofagije.

Istražujući mehanizme aktivacije AMPK pokazano je da indometacin indukuje smanjenje nivoa ATP i porast AMP u ćelijskoj kulturi U 251. U prethodno objavljenim publikacijama je pokazano da indometacin inhibira oksidativnu fosforilaciju i stimuliše ATP hidrolizu, što dovodi do energetske deplecije u gliomskim i drugim maligno transformisanim i netransformisanim ćelijama (Bernardi i sar., 2007; Cooney i sar., 1979; Jacob i sar., 2001). Iako nije nedvosmisleno dokazano, rezultati ukazuju da bi porast odnosa AMP/ATP mogao biti glavni mehanizam aktivacije AMPK u ćelijama tretiranim indometacinom.

Deo eksperimenata u ovom istraživanju bio je urađen upravo na primarnim kulturama ćelija glioblastoma, koje su takođe bile osetljive na citotoksično dejstvo indometacina. Imunoblot analiza pokazala sličan obrazac aktivacije signalnog puta AMPK/mTORC1 u poređenju sa rezultatima u kulturi U251. Prvi podaci o antitumorskom dejstvu hemioterapeutika izbora temozolomida koji se danas koristi u terapiji glioma, potiču od *in vitro* eksperimenata na ćelijskim linijam izolovanim iz humanog glioblastoma (Wedge i sar., 1997).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Pantovic A, Bosnjak M, Arsikin K, Kostic M, Mandic M, Ristic B, Tosic J, Suzin-Zivkovic V, Grujicic D, Isakovic A, Trajkovic V, Harhaji-Trajkovic Lj. In vitro antiglioma action of indomethacin is mediated through AMPK/mTOR complex 1 signaling pathway. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2016; 83:84-96

Pantovic A, Arsikin K, Kosic M, Ristic B, Trajkovic V, Harhaji-Trajkovic L. Data supporting the inability of indomethacin to induce autophagy in U251 glioma cells. *Data in Brief*. 2017; 11:225-230

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija dr Aleksandra Č. Pantovića pod nazivom „Uloga adenozin-monofosfatom aktivirane protein-kinaze i mTOR kompleksa 1 u *in vitro* citotoksičnom dejstvu nesteroidnih anti-inflamatornih lekova na ćelije glioma“ predstavlja originalan rad iz oblasti molekularne biomedicine. Značaj ove doktorske disertacije je u tome što ovo prvo istraživanje u kojem je pokazana uloga AMPK/mTORC1 signalnog puta u indukciji ćelijske smrti nesteroidnim anti-inflamatornim lekom indometacinom u liniji glioma U251 i ćelijama izolovanim iz tkiva pacijenata obolelih od glioblastoma. Osim toga, utvrđeno je i da indometacin citotoksične efekte na ćelije glioblastoma U251 ostvaruje nezavisno od procesa autofagije na čiju aktivnost nije imao uticaj. Drugi ispitivani nesteroidni anti-inflamatorni lekovi ili nisu imali ili su imali značajno manji citotoksični efekat od indometacina koji je jedini od ispitivanih lekova pokazao uticaj na povećanje AMPK na ćelije glioma *in vitro*.

Ova doktorska disertacija je urađena uz poštovanje svih principa načno-istraživčkog rada. Ciljevi su jasno definisani, istraživački pristup je bio originalan prema dobijenim rezultatima nadalje usmeravan, a metodologija rada je bila u skladu sa

visokim standardom koju institucija u kojoj je istraživanje obavljeno omogućuje. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju kandidata dr Aleksandra Pantovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Mentor:

Članovi Komisije:

Prof. dr Vladimir Trajković

Prof. dr Aleksandra Isaković

Komentor:

N. sar. dr Mihajlo Bošnjak

Prof. dr Ivanka Marković

Prof. dr Evica Dinčić

U Beogradu, 17.07.2020.