

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 20.5.2021. godine, broj 9700/14-MM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Mehanizmi citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije *in vitro*“

kandidatkinje dr Marine M. Stamenković, zaposlene na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor teze je profesor dr Vladimir Trajković, a komentor, naučni saradnik dr Kristina Janjetović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ivanka Marković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Aleksandra Isaković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Dušan Popadić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. Prof. dr Silvana Andrić, profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
5. Dr Ljubica Vučićević, viši naučni saradnik na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Marine Stamenković napisana je na ukupno 111 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 13 shema i 40 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je definisan pojam autofagije i opisana je klasifikacija ovog procesa, kao i njegov značaj u fiziološkim i patološkim uslovima. Posebna pažnja usmerena je na detaljan prikaz najznačajnijih signalnih molekula i puteva neophodnih za odvijanje i regulaciju odgovarajućih faza autofagije. Prateći najnovije podatke iz literature, u posebnom odeljku opisani su različiti aspekti uloge autofagije u nastanku određenih vrsta tumora i njihovom lečenju citotoksičnim agensima. Takođe, uzevši u obzir postojanje bliske povezanosti između autofagije i programirane ćelijske smrti, apoptoze, doktorandkinja opisuje i proces apoptoze, signalne puteve i molekule od značaja za njegovo odvijanje, kao i moguće načine interakcije između autofagije i apoptoze. Detaljno je opisana i primena farmakološke inhibicije autofagije, kako u bazičnim istraživanjima u cilju izučavanja ovog procesa, tako i u kliničkim ispitivanjima za lečenje različitih vrsta tumora. U skladu sa samim predmetom istraživanja iz kojeg je teza proistekla, u uvodu su opisane osnovne karakteristike i mehanizmi dejstva najčešće korišćenih lizosomalnih inhibitora autofagije (LIA) - bafilomicina, hlorokina i amonijum hlorida. Takođe je dat i adekvatan prikaz novootkrivene funkcije inhibitora protonske pumpe pantoprazola, kao modulatora autofagnog procesa čija upotreba potencijalno može da se preusmeri od lečenja gastrointestinalnih poremećaja sa povišenom kiselošću prema terapiji tumora.

Ciljevi rada su precizno definisani, a podrazumevaju uporednu analizu molekularnih mehanizama citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije ispitivanjem uticaja bafilomicina, hlorokina, amonijum hlorida i pantoprazola na vijabilitet ćelija, tip ćelijske smrti i molekularnih mehanizama citotoksičnosti na ćelijama mišjeg melanoma (B16) i humanog glioma (U251).

U poglavlju „**Materijal i metode**“ detaljno su opisani protokoli svih eksperimentalnih procedura korišćenih u istraživanju iz kojeg je disertacija proistekla. Navedene su ćelijske linije, njihove karakteristike i uslovi održavanja, kao i svi reagensi i rastvori korišćeni u eksperimentalnom radu. U realizaciji ciljeva ove doktorske disertacije korišćeni su odgovarajući testovi za ispitivanje vijabiliteta ćelija, fazno-kontrastna mikroskopija za utvrđivanje morfoloških promena, protočna citofluorimetrija za analizu parametara ćelijske smrti, produkcije reaktivnih oblika kiseonika, aktivacije kaspaza, depolarizacije mitohondrija i autofagije, imunoblot analiza za određivanje ekspresije i aktivnosti proteina od interesa, transmisiona elektronska mikroskopija za ultrastrukturnu analizu ćelija, konfokalna mikroskopija za utvrđivanje promena u ćelijama karakterističnih za proces autofagije, metoda kvantitavne reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-qPCR) za utvrđivanje

nivoa ekspresije iRNK odgovarajućih molekula, metoda RNK interferencije za inhibiciju ekspresije određenih proteina i Čou-Talalaj metod za utvrđivanje tipova interakcije između farmakoloških inhibitora autofagije. Statistička analiza obuhvatila je primenu Studentovog t-testa za dva nezavisna uzorka ili jednofaktorsku analizu varijanse (ANOVA) za više nezavisnih uzoraka praćenu Student-Newman-Keuls-ovim testom za višestruka poređenja. Ova studija odobrena je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

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

Diskusija prikazuje najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada koji odgovaraju postavljenim ciljevima teze.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 383 reference.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u finalnom izveštaju iz programa *iThenticate* kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Mehanizmi citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije *in vitro*“, autora Marine M. Stamenković, utvrđeno podudaranje teksta iznosilo je 16%.

Najveći stepen poklapanje pronađen je u poglavlju poglavlju 3 („Materijali i metode“), gde je program *iThenticate* kao tačke podudarnosti prepoznao nazive većine upotrebljenih hemikalija i reagenasa, njihovih proizvođače, kao i navedene koncentracije supstanci i njihova razblaženja. Prepoznati su i nazivi samih metoda, kako u Sadržaju tako i u samim podnaslovima, kao i deo uputstava za sprovođenje eksperimentalnih metoda, pri čemu ni jedna rečenica nije prepoznata kao misaona celina koja je identična nekom drugom sadržaju. Verujemo da ne bi bilo moguće dalje značajno smanjiti procenat podudarnosti bez izostavljanja ključnih podataka o materijalima i smanjivanja tačnosti i preciznosti objašnjenja metoda koje su korišćene u izradi ove disertacije, a koje bi išlo nauštrb reproducibilnosti rezultata. Ostatak podudarnosti se odnosio na korišćenje opšteprihvaćenih i široko korišćenih reči i fraza u opisivanju bioloških procesa koji se pominju u disertaciji, kao i pominjanje određenih ličnih imena, imena institucija, i sl. Pored toga, u svim ostalim poglavljima disertacije, osim nužnih podudaranja pomenutih opštih mesta, nisu nađene podudarnosti sa navedenim tvrdnjama ili misaonim celinama.

S druge strane, u poglavljima 1 („Uvod”), 2 („Ciljevi”), 4 („Rezultati”), 5 („Diskusija”) i 6 („Zaključci”), nađena je podudarnost prevashodno u citatima, te pojedinačnim rečima i često korišćenim frazama koje se tiču opisivanih procesa, prevashodno opšteprihvaćenih skraćenih i punih imena signalnih molekula koje se obrađuju u disertaciji. Napominjemo da nijedna misaona celina, niti pojedinačna tvrdnja izneta u poglavljima 4 („Rezultati”), 5 („Diskusija”) i 6 („Zaključci”), gde se apsolutno zahteva originalnost i autentičnost u doprinosu naučno-istraživačkom radu, nije pokazala podudarnost sa do sad objavljenim radovima, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Ispitivanjem mehanizama citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije utvrđeno je da bafilomicin, hlorokin i amonijum hlorid dovode do dozno i vremenski zavisnog smanjenja vijabiliteta B16 i U251 ćelija, kao i morfoloških promena koje su karakteristične za ćelijsku smrt. Ultrastrukturna analiza ćelija transmisionom elektronskom mikroskopijom pokazala je da sva tri inhibitora indukuju apoptozu ćelija melanoma, što je dodatno potvrđeno ispitivanjem tipa ćelijske smrti i ćelijskog ciklusa primenom protočne citofluorimetrije. Pored navedenog, sva tri inhibitora su dovela su do povećanja produkcije reaktivnih oblika kiseonika, depolarizacije mitohondrija i aktivacije kaspaza, dok je imunoblot analizom pokazano i isecanje PARP-1 molekula, ključnog supstrata kaspaza. Primenom RNK interferencije za inhibiciju LC3, ključnog markera autofagije, utvrđeno je da je smrt ćelija melanoma nezavisna od inhibicije autofagije. Analizom ekspresije iRNK za regulatore apoptoze pomoću RT-qPCR, utvrđeno je da svaki od inhibitora pokazuje specifičan obrazac ekspresije - bafilomicin je doveo do smanjenja iRNK anti-apoptotskog Bcl-2, dok su hlorokin i amonijum hlorid doveli do povećanja ekspresije iRNK za pro-apoptotske molekule Pten, Puma i Bcl-xL, uz dodatno povećanje ekspresije iRNK Bim i p53 molekula od strane amonijum hlorida. Inhibicija autofagije potvrđena je transmisionom elektronskom mikroskopijom koja je pokazala akumulaciju autofagnih vezikula u ćelijama melanoma. Sposobnost inhibicije autofagije ćelija melanoma dodatno je potvrđena imunoblot analizom konverzije glavnog autofagnog markera LC3-I u LC3-II formu, kao i metodom protočne citometrije kojom je utvrđena smanjena intracelularna acidifikacija B16 ćelija. Rezultati istraživanja takođe su pokazali da su lizosomalni katepsini koji se oslobađaju nakon permeabilizacije membrane lizozoma uključeni u ćelijsku smrt izazvanu hlorokinom, ali ne i bafilomicinom ili amonijum hloridom. Iako su sva tri inhibitora dovela do smanjenja aktivnosti mTOR i njegovog supstrata p70S6 kinaze, njihov citotoksični efekat bio je

nezavisan od inhibicije mTOR u ćelijama melanoma. Takođe je utvrđeno su da sva tri inhibitora povećala aktivnost p38 MAPK, koja je imala značajnu ulogu u citotoksičnosti bafilomicina, dok je ispoljila zaštitni efekat u ćelijama melanoma izloženim dejstvu hlorokina i amonijum hlorida. Sa druge strane, MAP kinaza ERK je ispoljila protektivno dejstvo u smrti B16 ćelija izazvanoj hlorokinom, a JNK kinaza u ćelijskoj smrti izazvanoj amonijum hloridom, dok je AMPK imala značajnu ulogu u povećanju citotoksičnosti bafilomicina. Primenom Čou-Talalaj metode pokazano je da sva tri inhibitora ispoljavaju međusobno antagonističko dejstvo u ubijanju tumorskih ćelija. Imunoblot analizom i primenom odgovarajućih inhibitora kod ćelija humanog glioma U251 pokazano je da, slično kao i kod B16 ćelija, p38 MAP kinaza ima značajnu ulogu u povećanju citotoksičnosti bafilomicina, dok su JNK i ERK kinaza ispoljavale zaštitni efekat u U251 ćelijama tretiranim hlorokinom i amonijum hloridom. Sa druge strane, energetski senzor AMPK nije imao značajnu ulogu u citotoksičnosti lizozomalnih inhibitora autofagije kod ćelija humanog glioma.

Ispitivanjem efekata inhibitora protonske pumpe pantoprazola na B16 i U251 ćelijama utvrđeno je da ovaj lek dovodi do dozno i vremenski zavisnog smanjenja njihovog vijabiliteta, dok su morfološkom analizom ćelija zapažene promene karakteristične za ćelijsku smrt. Pantoprazol je doveo do produkcije reaktivnih oblika kiseonika, aktivacije kaspaza, fragmentacije DNK i apoptoze, što je utvrđeno protočnom citofluorimetrijom. Imunoblot analizom utvrđeno je da pantoprazol dovodi do povećanja konverzije glavnog markera LC3-I u LC3-II i razgradnje p62, selektivnog supstrata autofagije, u ćelijama mišjeg melanoma, dok je kod ćelija humanog glioma zapažen njegov blagi porast. Ispitivanjem autofagnog fluksa kao pravog merila aktivnosti autofagije utvrđeno je da pantoprazol dovodi do indukcije ovog procesa kod obe ćelijske linije. Dodatna potvrda aktivacije autofagije kod ćelija humanog glioma sprovedena je konfokalnom mikroskopskom analizom agregacije LC3. RT-qPCR metodom utvrđen je različiti obrazac ekspresije regulatora autofagije, i to povećanje iRNK za Atg12, Gabarap i SQSTM1/p62 u ćelijama mišjeg melanoma, a Atf4, Foxo3, Atg13, AMBRA1, Vps34, FIP200, UVRAG i SQSTM1/p62 u ćelijama humanog glioma. Ispitivanjem aktivnosti signalnih molekula značajnih u regulaciji autofagije utvrđeno je da pantoprazol aktivira AMPK i dovodi do inhibicije mTOR/Akt signalnog puta kod obe ćelijske linije, dok je aktivnost Beklina-1 bila povećana samo kod ćelija mišjeg melanoma. RNK interferencijom pokazano je da u citotoksičnosti pantoprazola kod B16 ćelija AMPK i Beklin-1 ispoljavaju protektivno dejstvo, dok p38 MAPK nema uticaj na preživljavanje ovih ćelija. Sa druge strane, kod ćelija humanog glioma ova kinaza imala je značajnu protektivnu ulogu.

Inkubacija sa netoksičnim dozama bafilomicina, hlorokina i amonijum hlorida potvrdila je da je pantoprazol indukovao citoprotektivnu autofagiju kod obe ćelijske linije. Pored navedenog, pantoprazol je doveo i do indukcije stresa endoplazmatskog retikuluma detektovanog povećanjem ekspresije CHOP, koja je bila pod direktnom kontrolom p38 MAPK u U251 ćelijama. U istraživanju je takođe pokazano da u ćelijama humanog glioma tretiranim pantoprazolom AMPK i p38 MAPK ispoljavaju međusobno nezavisno protektivno dejstvo.

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U ispitivanju efekata LIA utvrđeno je da bafilomicin, hlorokin i amonijum hlorid u ćelijama melanoma indukuju apoptozu praćenu produkcijom reaktivnih oblika kiseonika i depolarizacijom mitohondrija. Ovo je u saglasnosti sa prethodno sprovedenim studijama gde su uočeni slični efekti amonijum hlorida i hlorokina u *in vivo* i *in vitro* uslovima (Cheng i sar., 2015, Kim i sar., 2010). Takođe, sposobnost LIA da aktiviraju apoptozu zavisnu od kaspaza u skladu je sa rezultatima istraživanja u kojima su sličan efekat imali bafilomicin u ćelijama neuroblastoma (Pivtoraiko i sar., 2010), hlorokin u ćelijama cervikalnog karcinoma, glioblastoma i limfoma (Kim i sar., 2010, Boya i sar., 2003, Masud Alam i sar., 2016), kao i amonijum hlorid u *in vivo* i *in vitro* uslovima (Suzuki i sar., 2002, Cheng i sar., 2015). Pored aktivacije kaspaza, smrt ćelija melanoma praćena isecanjem PARP-1 u saglasnosti je sa prethodno objavljenim podacima (Chen i sar., 2012, Hong i sar., 2013, Lin i sar., 2017, Gao i sar., 2015, Lakhter i sar., 2013). U istraživanju iz kojeg je teza proistekla, utvrđeno je da, iako sva tri LIA uspešno blokiraju autofagiju, smrt ćelija melanoma nije zavisila od inhibicije autofagije. U skladu sa navedenim, rezultati prethodnih studija su pokazali da upotreba nižih koncentracija lizozomalnih inhibitora i/ili kraći inkubacioni period mogu da povećaju osetljivost ćelija na različite citotoksične stimulse bez indukcije ćelijske smrti (Bosnjak i sar., 2014, Harhaji-Trajkovic i sar., 2009, Isakovic i sar., 2017, Krmpot i sar., 2010, Vucicevic i sar., 2011). Takođe, u studijama na ćelijama karcinoma pluća, pankreasa i glioblastoma (Enzenmuller i sar., 2013, Fu i sar., 2018, Hsu i sar., 2018, Seitz i sar., 2013), slično podacima koji su dobijeni u ovom istraživanju na ćelijama melanoma, inhibicija katepsina dovela je do smanjenja citotoksičnog efekta hlorokina. Sa druge strane, ovakav efekat nije zapažen kod primene bafilomicina i amonijum hlorida, što je u saglasnosti sa istraživanjima sprovedenim na drugim ćelijskim linijama (Denamur i sar., 2011, Jessop i sar., 2017, Persson i sar., 2012). U istraživanju je otkriveno i da bafilomicin utiče na smanjenje nivoa Bcl-2, što je slično prethodno sprovedenim studijama (Gao i sar., 2018, Hettiarachchi i sar., 2006). Rezultati ove doktorske disertacije su takođe u skladu sa studijama u kojima je pojedinačno povećanje

ekspresije Pten, Puma, Bim ili p53 bilo dovoljno da indukuje apoptozu u različitim tipovima tumorskih ćelija (Li i sar., 2007, Liu i sar., 2005, Shao i sar., 2000, Zhang i sar., 2006). U okviru rezultata teze pokazano je da su u B16 ćelijama sva tri LIA inhibirala fosforilaciju mTOR i njegovog supstrata pS6 kinaze, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama (Li i sar., 2013) i ulogom lizozoma u aktivaciji mTOR. Ispitivanje aktivnost MAP kinaza i AMPK pokazalo je da su sva tri inhibitora aktivirala p38 MAPK, dok je isključivo bafilomicin aktivirao AMPK, hlorokin ERK, a amonijum hlorid JNK. U skladu s tim, prethodne studije na različitim tipovima zdravih i tumorskih ćelija pokazale su da sva tri inhibitora mogu da aktiviraju p38 MAPK (Chen i sar., 2005, Pan i sar., 2010, Shrode i sar., 1997, Yan i sar., 2016), bafilomicin AMPK (Marrone i sar., 2018), hlorokin ERK (Bell i sar., 2016, Said i sar., 2014), a amonijum hlorid JNK (Novoselova i sar., 2012). U istraživanju iz kojeg je proistekla teza, citotoksičnost bafilomicina na ćelijama mišjeg melanoma je delom zavisila od p38 MAPK, a ovakav pro-apoptotski efekat zapažen je kod ćelija kolorektalnog (Wu i sar., 2009b) i hepatocelularnog karcinoma (Yan i sar., 2016). Dodatno, rezultati prikazani u tezi pokazali su da ERK i JNK sprečavaju smrt ćelija humanog glioma tretiranih amonijum hloridom, dok ne utiču na preživljavanje ćelija tretiranih bafilomicinom ili hlorokinom. Iako nema dostupnih podataka o efektu amonijum hlorida na ERK i JNK, protektivno dejstvo ovih enzima pokazano je u nekoliko različitih studija sprovedenih na zdravom tkivu i tumorskim ćelijama, među kojima su i ćelije glioblastoma (Matsuda i sar., 2012, Liu i sar., 2018, Wu i sar., 2013, Sadoshima i sar., 2002, Hu i sar., 2017). Rezultati ove disertacije pokazali su citotoksični efekat pantoprazola na ćelijskim linijama mišjeg melanoma i humanog glioma, koji je ostvaren indukcijom apoptoze kojoj su prethodili oksidativni stres i aktivacija kaspaza. Antitumorsko dejstvo pantoprazola prethodno je pokazano na ćelijama humanog karcinoma želuca, uz odsustvo citotoksičnosti na zdravim ćelijama želučnog tkiva (Yeo i sar., 2004). Takođe, u skladu sa dobijenim rezultatima su i podaci o ostalim lekovima iz grupe inhibitora protonskih pumpi, omeprazola i esomeprazola, koji su indukovali su apoptozu kod humanih B ćelijskih tumora, melanoma, karcinoma dojke i glioma (De Milito i sar., 2007, Marino i sar., 2010, Ihraiz i sar., 2020, Liu i sar., 2017, Geeviman i sar., 2018). Sposobnost pantoprazola da inhibira zakišeljavanje lizozoma u saglasnosti je sa prethodno sprovedenim studijama u kojima je pokazano da inhibitori protonske pumpe uspešno vrše alkalizaciju kiselih ćelijskih odeljaka (De Milito i sar., 2007, Cao i sar., 2018). Dok studije sprovedene na ćelijskim linijama karcinoma pankreasa, dojke, prostate i želuca pokazuju da omeprazol i pantoprazol mogu da inhibiraju autofagiju (Tan i sar., 2017, Feng i sar., 2021), postoje i istraživanja koje ukazuju da pantoprazol može da dovede do indukcije ovog procesa (Marino i sar., 2010,

Chueca i sar., 2016, Cao i sar., 2018), kao što je prikazano u rezultatima ove doktorske disertacije. Takođe, rezultati ovog istraživanja su pokazali da u ćelijama mišjeg melanoma i humanog glioma pantoprazol dovodi do aktivacije AMPK, što do sada nije pokazano u literaturi. Sa druge strane, neke od prethodnih studija su pokazale da kod ćelija adenokarcinoma želuca tretman pantoprazolom dovodi do smanjenja ekspresije iRNK za PI3K, AKT i mTOR i inhibicije PI3K/AKT/mTOR signalnog puta (Chen i sar., 2018b, Cao i sar., 2018), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na ćelijama mišjeg melanoma i humanog glioma. Uticaj inhibitora protonskih pumpi na MAPK signalne puteve prvi put je ispitivan na ćelijskim linijama karcinoma raka želuca, gde je pokazan značaj selektivne aktivacije p38 MAPK u indukciji apoptoze u odnosu na zdrave ćelije želudačnog tkiva (Yeo i sar., 2004). Sa druge strane, na mišjem modelu multiple intestinalne neoplazije pokazano je da pantoprazol dovodi do inhibicije p38 MAPK (Han i sar., 2014), kao i da ispoljava anti-inflamatorno dejstvo supresijom p38 MAPK u polimorfonuklearnim leukocitima (Koshio i sar., 2010). Takođe je pokazana veza između produkcije reaktivnih oblika kiseonika i povećanja aktivnosti p38 MAPK u različitim tipovima tumorskih ćelija tretiranim pantoprazolom (Cao i sar., 2018). Suprotno navedenom, rezultati ove disertacije dobijeni na B16 ćelijama pokazali su da ćelijska smrt indukovana pantoprazolom ne zavisi od aktivacije p38 MAPK. Uticaj inhibitora protonskih pumpi na pojavu ER stresa do sada je ispitivan samo na ćelijskoj liniji adenokarcinoma želuca kod koje je pantoprazol uzrokovao inhibiciju proteazoma sa posledičnim nagomilavanjem proteina i indukcijom ER stresa (Cao i sar., 2018). U skladu sa tim, rezultati ove disertacije pokazali su da i kod ćelija humanog glioma pantoprazol dovodi do aktivacije CHOP kao markera ER stresa.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Marina Stamenkovic, Kristina Janjetovic, Verica Paunovic, Darko Ciric, Tamara Kravic-Stevovic, Vladimir Trajkovic. Comparative analysis of cell death mechanisms induced by lysosomal autophagy inhibitors. European Journal Of Pharmacology (2019) 15; 859:172540.

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Mehanizmi citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije *in vitro*“ predstavlja originalni naučni doprinos, uzevši u obzir da ni u jednom do sada sprovedenom istraživanju nije izvršena uporedna analiza citotoksičnosti lizozomalnih inhibitora autofagije bafilomicina, hlorokina i amonijum hlorida pod istim eksperimentalnim

uslovima *in vitro*. Takođe, istraživanje iz kojeg je teza proistekla je po prvi put obuhvatilo i detaljno ispitivanje molekularnih mehanizama citotoksičnosti inhibitora protonske pumpe pantoprazola. Specifični mehanizmi dejstva LIA nezavisni od inhibicije autofagije, pokazani u ovom istraživanju, moraju biti uzeti u obzir kada se ovi agensi koriste za inhibiciju autofagije, kako u bazičnim, tako i u kliničkim istraživanjima. Takođe, dobijeni rezultati pružaju mogućnost drugačijeg pristupa u poboljšanju antitumorskog efekta LIA, pre svega hlorokina, kao jedinog do sada odobrenog farmakološkog inhibitora autofagije u terapijskoj modulaciji ovog procesa. Protektivni efekti p38 MAPK i AMPK predstavljaju slabe tačke u citotoksičnosti ovih agenasa, koja bi mogla da se pojača primenom odgovarajućih kinaznih inhibitora. Sa druge strane, uzevši u obzir pokazani antitumorski efekat i povoljne karakteristike pantoprazola, pre svega njegovu čestu kliničku upotrebu i nisku toksičnost, novootkriveni mehanizmi dejstva ovog leka otvaraju mogućnost za upotrebu i poboljšanje njegovog učinka u terapiji tumora. Jedan od mogućih načina za poboljšanje antitumorskog delovanja pantoprazola mogao bi da bude kombinovanje sa niskim dozama klasičnih lizozomalnih inhibitora autofagije pomoću kojih bi se suprimirao citoprotektivni efekat indukovane autofagije, što je i pokazano u rezultatima disertacije. Takođe, otkrivena uloga AMPK i p38 MAPK u indukciji citoprotektivne autofagije u ćelijama humanog glioma ukazuje i na mogućnost kombinovanja pantoprazola sa selektivnim inhibitorima ovih kinaza.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. 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 kandidatkinje, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Marine M. Stamenković i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 7. 6. 2021.

Članovi Komisije:

Profesor dr Ivanka Marković

Mentor:

Profesor dr Vladimir Trajković

Profesor dr Aleksandra Isaković

Profesor dr Dušan Popadić

Profesor dr Silvana Andrić

Viši naučni saradnik dr Ljubica Vučićević

Komentor:

Naučni saradnik dr Kristina Janjetović
