

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На III редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 09.12.2016. године, прихваћен је извештај ментора проф. др Гордане Матић и др Милице Пешић о урађеној докторској дисертацији Соње М. Стојковић Бурић, истраживача сарадника на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, под насловом „**Модел ћелија Ц6 глиома пацова као оруђе за проналажење нових терапеутских стратегија: карактеризација резистентног фенотипа *in vitro* и *in vivo***“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу проф. др Гордана Матић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Милица Пешић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду и др Ана Подолски-Ренић, научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Соње М. Стојковић Бурић под насловом „**Модел ћелија Ц6 глиома пацова као оруђе за проналажење нових терапеутских стратегија: карактеризација резистентног фенотипа *in vitro* и *in vivo***“ урађена је на Одељењу за неуробиологију на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, уз финансијску подршку Министарства за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије (кандидаткиња је истраживач сарадник на пројекту ИИИ41031).

Докторска дисертација садржи 125 страна. Подељена је на уобичајена поглавља: **Увод** (30 страна); **Циљеви рада** (2 стране); **Материјал и методе** (25 страна); **Резултати** (37 страна); **Дискусија** (13 страна); **Закључци** (2 стране); **Литература** (16 страна). Дисертација садржи 44 слике (10 у поглављу Увод, 1 у поглављу Материјал и методе и 33 у поглављу Резултати) и 4 табеле (1 у поглављу Материјали и методе и 3 у поглављу Резултати). У поглављу Литература је цитирано 196 библиографских јединица. Дисертација садржи и Сажетке на српском и енглеском језику, Информације о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Садржај као и Листу скраћеница. 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:

У **Уводу** кандидаткиња Соња М. Стојковић Бурић даје јасан преглед података из научне литературе који се односе на проблематику докторске дисертације. Кандидаткиња нас најпре упознаје са општим карактеристикама канцера и његовим поделама. У

поглављу „Тумори централног нервног система“ описана је општа подела и статистички подаци везани за туморе централног нервног система са освртом на поделу и генетичке одлике глиома. Посебна пажња је посвећена специфичним молекуларним маркерима и сигналним путевима који су одговорни за настанак и прогресију глиома, као и инвазивним карактеристикама и молекуларним маркерима укљученим у процес инвазије. У оквиру овог поглавља је описана терапија високоградусних глиома и механизам деловања 1,3-бис(2-хлороетил)-1-нитрозоуреа (БЦНУ, кармустин) и темозоломида (ТМЗ) који представљају стандард у терапији овог типа тумора. Како је у фокусу ове докторске дисертације резистенција на хемиотерапију, следеће поглавље се управо бави фармаколошким и ћелијским механизмима резистенције на хемиотерапију и поред тога објашњава феномен колатералне сензитивности. У наредном поглављу под насловом „Ц6 анимални модел глиома“ дат је детаљан молекуларно генетички приказ Ц6 пацовске ћелијске линије глиома и указано је на висок степен сличности са молекуларно генетичким карактеристикама хуманих глиобластома. У последњем поглављу описан је значај продукције реактивних кисеоничних врста (РОС) и појаве оксидативног стреса у настанку резистенције на терапију. Значајан део овог поглавља је посвећен антиоксидативном систему за регулацију и уклањање РОС-а, као и појави хипоксије и адаптације на повишен ниво РОС-а. Посебан нагласак је стављен на антиоксидативну улогу коензима Q10.

На основу представљених литературних података, постављени су следећи **Циљеви** истраживања ове докторске дисертације: 1) успоставити резистенцију на кармустин (БЦНУ) код пацовске Ц6 глиомске ћелијске линије и окарактерисати резистентни фенотип *in vitro* на нивоу промена у апоптотској машинерији, оштећења на ДНК ланцима, степена продукције РОС-а, промена у антиоксидативном капацитету и експресији транспортних пумпи, као и разлика у стопи пролиферације и инвазивности паренталне Ц6 и резистентне РЦ6 ћелијске линије, 2) развити анимални модел резистентног глиома инокулацијом РЦ6 ћелија у мозак Wistar пацова и упоредити Ц6 и РЦ6 анимални модел у погледу инфилтрације ћелија у мождани паренхим и неуролошких промена на нивоу понашања, 3) испитати ефикасност нове терапеутске стратегије антиоксиданта коензима Q10 са темозоломидом у РЦ6 моделу, у погледу повећања осетљивости РЦ6 ћелија на ТМЗ, утицаја појединачних и комбинованог третмана на индукцију ћелијске смрти и инвазивност у 2Д и 3Д системима, као и ефикасност предложене терапеутске стратегије у РЦ6 анималном моделу.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** кандидаткиња је детаљно описала све фазе експерименталног рада. У почетном делу су наведене хемикалије и лекови, као и пацовска Ц6 ћелијска линија глиома коришћена као почетни материјал у докторској дисертацији. Затим је описан сулфородамин Б тест вијабилности, испитивање раста ћелија у реалном времену на xCELLigence RTCA систему и анализа ћелијске смрти Анексин V/ пропидијум јодид есејем методама проточне цитофлуориметрије и флуоресцентне микроскопије. Детаљно су описани принципи и процедуре за изолацију и анализу експресије иРНК про-апоптотских и анти-апоптотских фактора, антиоксидативног система, транспортних пумпи и протеаза, као и протеина апоптотске машинерије методама реакције ланчаног умножавања и „Western blot“ анализом. Анализа присуства кисеоничних врста, акумулација доксорубицина и унутарћелијски рН су испитивани методом проточне цитофлуориметрије, док је за анализу концентрације глутатиона коришћен пакет за колориметријску детекцију. Индукција ДНК оштећења је испитивана помоћу хистон H2A.X антитела методом флуоресцентне микроскопије. Инвазивност ћелија *in vitro* је анализирана методама деградације желатина, матригел тестом

инвазивности, као и тестом формирања и инвазије сфероида. У циљу испитивања ефикасности предложене терапеутске стратегије коришћен је и модел глиома у микрофлуидним чиповима. Даље је детаљно описан експериментални дизајн анималног модела који укључује интракранијалну инокулацију флуоресцентно обележених сензитивних и резистентних ћелија, приказ третмана животиња са инокулисаним резистентним ћелијама и флуоресцентно обележавање можданих пресека са Ки67 антителом за потврђивање присуства сензитивних и резистентних ћелија у можданом паренхиму. Животиње са инокулисаним сензитивним и резистентним ћелијама су такође подвргнуте тестовима моторичке активности. У завршном делу овог поглавља описан је начин статистичке обраде добијених података.

У поглављу **Резултати** добијени експериментални подаци су подељени у логично организоване целине, јасно приказани сликама и табелама уз примену одговарајуће статистичке обраде. Представљање резултата ове докторске дисертације започиње описом поступка изазивања резистенције Ц6 глиомске ћелијске линије на кармустин и анализе степена резистенције код полазне Ц6 и новоуспостављене резистентне РЦ6 ћелијске линије. У следећем делу су испитивани механизми резистенције присутни код РЦ6 ћелија, где је показано да је континуирана примена кармустина довела до резистенције не само на овај хемиотерапеутик, већ и на друге ДНК оштеђујуће агенсе, цисплатин и темозоломид. Резистентна РЦ6 линија показује смањену осетљивост на индукцију ћелијске смрти која је праћена смањењем експресије антиапоптог фактора *Bcl-2*, проапоптог фактора *Bad* и ефекторске *каспазе 3* на нивоу иРНК и протеина. Такође је показано смањење експресије иРНК антиапоптог фактора *Bcl-Xl* и проапоптог фактора *Bax*. Резистентна линија показује и смањено оштећење ДНК ланаца под деловањем ових хемиотерапеутика. Развој резистенције је довео и до значајног повећања продукције РОС-а и смањења односа концентрације оксидованог и редукованог глутатиона. Запажено је повећање експресије иРНК за *MnSOD*, *iNOS* и *GPx* и смањење експресије иРНК за *Hif1a* код РЦ6 ћелија у односу на Ц6 ћелије. РЦ6 ћелије показују повећану осетљивост на деловање доксорубицина у односу на Ц6 ћелије, што се огледа кроз повећање осетљивости на индукцију ћелијске смрти и повећање оштећења ДНК ланаца код РЦ6 ћелија под деловањем овог агенса. Као логичан наставак добијених резултата даље је вршено испитивање механизма колатералне сензитивности РЦ6 ћелија на доксорубицин. Утврђено је да РЦ6 ћелије акумулирају више доксорубицина од Ц6 ћелија. Значајно смањење експресије иРНК за *Abcb1* и повећање експресије иРНК за *Mrp1* транспортне пумпе, као и смањење унутарћелијског рН је такође уочено код РЦ6 ћелија. У наставку је показано да РЦ6 ћелије пролиферишу знатно спорије у односу на Ц6 ћелије. РЦ6 ћелије испољавају снижену експресију иРНК за *Mmp2* и повишену експресију за *Mmp9*, док 2Д и 3Д тестови инвазивности указују на повећани инвазивни потенцијал *in vitro*. Анималне студије су показале да флуоресценца пореклом од инокулисаних ћелија колокализује са флуоресценцом пореклом од антитела за маркер пролиферације Ки67, а резултат је потврдио већу способност инвазије РЦ6 ћелија у мождани паренхим у односу на Ц6 ћелије. Поред тога, тестови моторичке активности указују на израженије поремећаје у хабитуацији и адаптацији на средину код животиња са инокулисаним РЦ6 ћелијама. У последњем делу резултата испитивана је ефикасност комбинованог третмана антиоксиданта коензима Q10 са антиглиомским агенсом ТМ3-ом у РЦ6 моделу. Резултати показују да коензим Q10 не само да повећава осетљивост РЦ6 ћелија на ТМ3, већ комбинација ова два агенса ефикасно инхибира миграцију и инвазију РЦ6 ћелија и РЦ6 сфероида. Комбиновани третман такође доводи до појаве ширих региона некрозе у односу на појединачне третмане у 3Д систему микрофлуидних чипова. Механизам деловања коензима Q10 преко смањења РОС-а код РЦ6 ћелија је такође показан у 3Д систему

микрофлуидних чипова. У РЦ6 анималном моделу комбиновани третман доводи до инхибиције пролиферације и инвазије глиомских ћелија што представља потврду резултата добијених у *in vitro* системима.

У оквиру поглавља **Дискусија** кандидаткиња је дала критички осврт на своје резултате користећи постојеће литературне податке из дате области. Ово поглавље је подељено на пет одељака који доприносе бољем разумевању тумачења добијених резултата. Први део се односи на карактеризацију резистентног фенотипа РЦ6 глиомских ћелија. Кандидаткиња истиче да је промена у равнотежи чланова унутрашњег митохондријалног пута, смањена експресија ефекторске каспазе 3, смањено присуство фосфорилисане форме H2A.X и повећана продукција РОС-а честа појава код различитих типова туморских ћелија, те истиче значај добијених промена у развоју резистенције на ДНК оштећујуће агенсе кармустин, цисплатин и темозоломид код РЦ6 ћелија. Адаптација на повишен ниво РОС-а је праћена повећањем експресије ензима укључених у антиоксидативну одбрану, као и појавом агресивнијег и резистентнијег фенотипа туморских ћелија. У другом делу, дато је тумачење механизма колатералне сензитивности РЦ6 ћелија на доксорубицин. Као главни разлог повећане акумулације доксорубицина у РЦ6 ћелијама се наводи смањење унутарћелијског рН које је последица повећане акумулације РОС-а и утиче на јонизацију и акумулацију доксорубицина који је слаба база. Наводи се да акумулацији доприноси и смањење експресије иРНК за *Abcb1* транспортну пумпу чији је супстрат доксорубицин, док повећање експресије иРНК за *Mrp1* транспортер доприноси антиоксидативном капацитету РЦ6 ћелија. У трећем делу је указано на то да спорија пролиферација и инвазивнији фенотип карактеришу РЦ6 ћелије што се подудара са литературним подацима који повезују примећене одлике са појавом резистентних тумора. Кандидаткиња истиче да на инвазивност РЦ6 ћелија утиче повећана експресија иРНК за матриксну металопротеиназу *Mmp9* и повећана продукција РОС-а. Четврти део се односи на понашање инокулисаних Ц6 и РЦ6 ћелија у *in vivo* моделу ортотопног алогофта имуно компетентних Wistar пацова. Како су Ц6 ћелије уочене око и у близини места инокулације у обе испитиване временске тачке (10. и 25. дан након инокулације), а РЦ6 ћелије у региону олфакторног булбуса и удаљеним можданим структурама, указано је на већи инвазивни потенцијал РЦ6 ћелија и у анималном моделу. Животиње у РЦ6 групи испољавају изражене промене у препознавању и адаптацији на средину у којој се налазе, што указује на улогу региона у који су ћелије инокулисане (моторни кортекс) у процесу учења. Последњи део дискусије се односи на нову комбиновану терапеутску стратегију испитану у РЦ6 моделу и даје критички осврт на агенсе до сада коришћене у комбинацији са ТМ3-ом, са акцентом на антиоксиданте. Показано је да комбиновани третман антиоксиданта коензима Q10 са ТМ3-ом повећава осетљивост РЦ6 ћелија на овај хемиотерапеутик, смањује инвазивни потенцијал РЦ6 ћелија у 2Д и 3Д системима и доводи до ширих региона некрозе у односу на појединачне третмане у 3Д систему микрофлуидних чипова. Указује се такође на потенцијални утицај смањене продукције РОС-а под утицајем коензима Q10 као механизма који доприноси синергизму са ТМ3. Резултати комбинованог третмана у РЦ6 анималном моделу потврђују резултате добијене *in vitro*.

У поглављу **Закључци**, изведени су концизни закључци проистекли из резултата истраживања. Кандидаткиња је сумирала закључке на следећи начин: континуирани третман Ц6 ћелија пацовског глиома са кармустином доводи до развоја резистенције не само на овај хемиотерапеутик, већ и на друге ДНК оштећујуће агенсе (цисплатин и темозоломид). Механизми резистенције присутни код новоуспостављене резистентне пацовске ћелијске линије глиома – РЦ6 укључују промену у равнотежи про- и

антиапоптотских чланова и смањену осетљивост на апоптозу, као и повећање антиоксидативног капацитета и адаптацију на оксидативни стрес. Повећани садржај РОС-а је повећао и киселост цитоплазме што је допринело већој акумулацији доксорубина и повећаној осетљивости РЦ6 ћелија на овај агенс. Повећани садржај РОС-а код РЦ6 ћелија је утицао на стварање фенотипа са већим инвазивним потенцијалом *in vitro* и *in vivo*. Тестови понашања показују израженије поремећаје у хабитуацији, препознавању и адаптацији на средину код животиња са инокулисаним РЦ6 ћелијама. Поред тога, РЦ6 модел се показао погодним у процени ефикасности нових терапеутских стратегија. Природни антиоксидант коензим Q10 је довео до сензитизације РЦ6 ћелија на ТМЗ, док комбинација ова два агенса доводи до инхибиције инвазије РЦ6 ћелија *in vitro* и *in vivo*, што даје подстицај за даља испитивања и потенцијалну примену коензима Q10 као суплемента у терапији глиома.

Завршно поглавље дисертације садржи листу коришћене **Литературе** која има 196 библиографске јединице, од којих је велики број најновијег датума. Референце су адекватно и на одговарајућим местима цитиране у тексту ове докторске дисертације.

#### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:**

##### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Stojković S**, Podolski-Renić A, Dinić J, Pavković Ž, Ayuso JM, Fernández LJ, Ochoa I, Pérez-García VM, Pešić V, Pešić M. Resistance to DNA damaging agents produced invasive phenotype of rat glioma cells-characterization of a new *in vivo* model. *Molecules*. 2016; 21(7). **(M22)**
2. **Stojković S**, Podolski-Renić A, Dinić J, Stanković T, Banković J, Hadžić S, Paunović V, Isaković A, Tanić N, Pešić M. Development of resistance to anti-glioma agents in rat C6 cells caused collateral sensitivity to doxorubicin. *Exp Cell Res*. 2015; 335(2):248-57. **(M22)**

##### Б1. Радови у часописима домаћег значаја

##### Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Stojkovic S**, Ayuso JM, Maria Virumbrales-Muñoz M, Podolski-Renic A, Dinic J, Ochoa I, Fernández, Pérez-García V, Pešić M. Anti-glioma approach with coenzyme Q assessed in microenvironmental mimicking conditions. Abstract book: 102. 2<sup>nd</sup> EACR Conference, Goodbye Flat Biology: Models, Mechanisms and Microenvironment, Berlin, Germany. October 2-5, 2016. **(M34)**
2. **Stojkovic S**, Podolski-Renic A, Hadzic S, Dinic J, Bankovic J, Stankovic T, Milosevic Z, Dragoj M, Pesic M. Characterization of new resistant C6 glioma model *in vitro* and *in vivo*. Abstract book: 43. FENS Featured Regional Meeting, Thessaloniki, Greece. October 7-10, 2015. **(M34)**

3. **Stojković S**, Podolski-Renić A, Hadžić S, Dinić J, Banković J, Stanković T, Milošević Z, Dragoj M, Pešić M. Changes in antioxidative capacity during development of drug resistance in rat C6 glioma cells. Abstract book: 86. Serbian society for mitochondrial and free-radical physiology - Third Congress REDOX MEDICINE Reactive Species Signaling, Analytical Methods, Phytopharmacy, Molecular Mechanisms of Disease, Belgrade, Serbia. September 25-26, 2015. **(M34)**
4. **Stojković S**, Podolski-Renić A, Hadžić S, Dinić J, Milošević Z, Dragoj M, Martinez González A, Pérez-García V, Durán Prado M, Pešić M. The influence of Coenzyme Q on temozolomide therapeutic efficacy in resistant rat C6 glioma. Abstract book: 143. II International Symposium on Clinical and Basic Investigation in Glioblastoma, Toledo, Spain. September 9-12, 2015. **(M34)**
5. **Stojković S**, Podolski-Renić A, Milosevic Z, Dinic J, Tanic N, Pesic M. The Modulation Of Apoptosis During Development Of Drug-Resistance in rat C6 Glioma Cells. Abstract book: 44. EORTC-EANO-ESMO Conference: Trends in Central Nervous System Malignancies, Prague, Czech Republic. March 22-23, 2013. **(M34)**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Stojković S**, Podolski-Renić A, Dinić J, Milošević Z, Banković J, Stanković T, Milinković V, Tanić N, Pešić M. Uloga povišene koncentracije slobodnih radikala u rezistenciji na karmustin i cisplatin kod pacovskih gliomskih C6 ćelije. Knjiga sažetaka str. 80. Drugi Kongres - Život sa slobodnim radikalima, Niš, Srbija. Septembar 28, 2013. **(M64)**

### **Мишљење и предлог Комисије:**

Увидом у докторску дисертацију Соње М. Стојковић Бурић, Комисија са задовољством може истаћи да приказани резултати дају научни допринос у области разумевања развоја резистенције на терапију код глиома, као и да отварају нове могућности за унапређење постојећих терапеутских приступа у лечењу овог тешког обољења.

Стога, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију и предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри Соњи М. Стојковић Бурић јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Модел ћелија Ц6 глиома пацова као оруђе за проналажење нових терапеутских стратегија: карактеризација резистентног фенотипа *in vitro* и *in vivo*”.

### **КОМИСИЈА:**

---

Проф. др Гордана Матић  
редовни професор Биолошког факултета  
Универзитета у Београду

---

Др Милица Пешић  
виши научни сарадник Института за биолошка  
истраживања „Синиша Станковић”

---

Др Ана Подолски-Ренић  
научни сарадник Института за биолошка  
истраживања „Синиша Станковић”

У Београду, 15.12.2016. године.