

Биолошки факултет
Број захтева:15/222-1
Датум: 06.04.2012.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду («Гласник Универзитета», број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Анализа антитуморског деловања агенаса модификованих азот моноксидом, саквинавир-NO и GIT-27NO на канцер колона *in vitro* и *in vivo*“.

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биологија, Имуноонкологија.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља и презиме кандидата:

Марија С. Мојић

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао високо образовање:

Биолошки факултет, Универзитет у Београду.

3. Година дипломирања: 2008.

4. Назив магистарске тезе кандидата: /

5. Назив факултета на коме је магистарска теза одбрањена: /

6. Година одбране магистарске тезе: /.

7. Година и назив факултета на коме је кандидат уписао докторске студије:

2008- Биолошки факултет, докторски програм/модул: Молекуларна биологија/
Молекуларна биологија еукариота.

Обавештамо Вас да је Наставно- научно веће Биолошког факултета Универзитета у Београду, на VI редовној седници одржаној 06.04.2012. год. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем.

2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације.

3. Подаци о ментору.

4. Решење Етичке Комисије ИБИСС-а.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

15/222-06.04.2012.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 12. Статута Биолошког факултета Универзитета у Београду, Наставно-научно веће Факултета, на VI редовној седници одржаној 06.04.2012. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за оцену испуњености услова и научне заснованости теме докторске дисертације кандидата:

Марије С. Мојић, дипломираног молекуларног биолога и физиолога, студента докторских студија, студијског програма Молекуларна биологија, под насловом:

„Анализа антитуморског деловања агенаса модификованих азот моноксидом, саквинавир-NO и GIT-27NO на канцер колона *in vitro* и *in vivo*“.

За менторе се именују:

1. Др Сања Мијатовић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду;
2. Др Гордана Матић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- ментору;
- Стручној служби Факултета.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата: **Марију Мојић**

А: Име и презиме ментора: **др Сања Мијатовић**

Звање: **виши научни сарадник ИБИСС-а**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Mijatovic, S.**, Maksimovic-Ivanic, D., Radovic, J., Miljkovic, Dj., Harhaji, Lj., Vuckovic, O., Stosic-Grujicic, S., Mostarica Stojkovic, M. & Trajkovic, V. (2005). Anti-glioma action of aloe emodin: the role of ERK inhibition. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(5):589-98.
2. **Mijatovic, S.**, Maksimovic-Ivanic, D., Timotijevic, G., Miljkovic, D., Donia, M., Libra, M., Coco, M., McCubrey, J., Al-Abed, Y., Korac, A., Stosic-Grujicic, S. & Nicoletti, F. (2010). Induction of caspase-independent apoptotic-like cell death of mouse mammary tumor TA3Ha cells in vitro and reduction of their lethality in vivo by the novel chemotherapeutic agent GIT-27NO. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(8), 1090-1099.
3. Maksimovic-Ivanic, D., **Mijatovic, S.**, Harhaji, L., Miljkovic, D., Dabideen, D., Fan Cheng, K., Mangano, K., Malaponte, G., Al-Abed, Y., Libra, M., Garotta, G., Nicoletti, F. & Stosic-Grujicic, S. (2008). Anticancer properties of the novel nitric oxide-donating compound (S,R)-3-phenyl-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid-nitric oxide in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(3), 510-520.
4. Mojic, M., **Mijatovic, S.**, Maksimovic-Ivanic, D., Dinic, S., Grdovic, N., Miljkovic, D., Stosic-Grujicic, S., Tumino, S., Fagone, P., Nicoletti, F., Zocca, M.B., Alabed, Y., McCubrey, J.A., Nicoletti, F. (2012). Saquinavir-NO-targeted S6 protein mediates sensitivity of androgen-dependent prostate cancer cells to TRAIL. *Cell Cycle*, 11(6)
5. Maksimovic-Ivanic, D., **Mijatovic, S.**, Miljkovic, D., Harhaji-Trajkovic, L., Timotijevic, G., Mojic, M., Dabideen, D., Cheng, K.F., McCubrey, J.A., Mangano, K., Al-Abed, Y., Libra, M., Garotta, G., Stosic-Grujicic, S. & Nicoletti, F. (2009). The antitumor properties of a nontoxic, nitric oxide-modified version of saquinavir are independent of Akt. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(5), 1169-1178.

Б: Име и презиме ментора: **др Гордана Матић**

Звање: **редовни професор Биолошког факултета**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Djordjevic, A., Djordjevic, J., Elaković, I., Adzic, M., **Matić, G.** & Radojicic, M.: Fluoxetine affects hippocampal plasticity, apoptosis and depressive-like behavior of chronically isolated rats., *Progr. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2012, 36:92-100.

2. Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M., Elaković, I., **Matić, G.** & Radojčić, M.: Fluoxetine affects antioxidant system and promotes apoptotic signaling in wistar rat liver. Eur. J. Pharmacol. 659, 2011, 61-66.
3. Vojnović Milutinović, D., Macut, D., Božić, I., Brkljačić, J., Damjanović, S. and **Matić, G.:** Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hypersensitivity and glucocorticoid receptor expression and function in women with polycystic ovary syndrome. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 2011, 119:636-643.
4. Elaković, I., Djordjevic, A., Adzic, M., Djordjevic, J., Radojčić, M. & **Matić, G.:** Gender-specific response of brain corticosteroid receptors to stress and fluoxetine. Brain Res. 2011, 1384: 61-68.
5. Brkljačić, J., Tanić, N., Vojnović Milutinović, D., Elaković, I., Manitašević Jovanović, S., Perišić, T., Dundjerski, J. & **Matić, G.:** Validation of endogenous controls for gene expression studies in peripheral lymphocytes from war veterans with and without PTSD. BMC Molecular Biology, 11, 2010, 26; doi: 10.1186/1471-2199-11-26.

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В, или Г):

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничко-технолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

Б) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релевантне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа, коју ће на предлог Универзитета донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41, и M51.)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски маистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односно дисертације.

Г) У случају да у ужуј научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

Декан Биолошког факултета

Датум: 06.04.2012.

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

НАСТАВНО–НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 09. 03. 2012. године, одређени смо у Комисију за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације **Марије С. Мојић**, под насловом: “Анализа антитуморског деловања агенаса модификованих азот моноксидом, саквинавир-NO и GIT-27NO на канцер колона *in vitro* и *in vivo*”.

На основу поднете документације и увида у досадашњи рад Марије С. Мојић, Комисија подноси Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографија:

Општи подаци:

Име, средње слово и презиме: Марија С. Мојић
Датум и место рођења: 16.10.1984. године, Београд

Образовање: ир

2008. Дипломирани молекуларни биолог и физиолог, Биолошки факултет,
Универзитет у Београду

2008/2012 Докторске студије, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Запослење:

Истраживач сарадник
Одељење за имунологију, Институт за биолошка истраживања “Синиша Станковић”

Курсеви:

2010. Дебрецен, Мађарска: Практични курс европске бихемијске федерације (FEBS) под називом „Технике у биологији слободних радикала“,

2011. Спетсес, Грчка: Напредни курс FEBS-EACR (европског друштва за истраживање канцера) под називом „Молекуларни механизми сигналне трансдукције и канцер“

Пројекти:

ON 173013) Молекулски механизми физиолошке и фармаколошке контроле инфламације и канцера

Чланство у научним друштвима:

1. Биохемијско друштво Србије
2. Српско друштво за митохондријалну и слободно-радикалску физиологију
3. Друштво имунолога Србије

Страни језици:

Енглески, немачки, турски и шпански језик

Посебне активности и награде:

2008. Пракса, Novartis Institutes for Biomedical Research (NIBR), Novartis Pharma AG, Базел, Швајцарска

2009. Пракса, Универзитет у Токију, Јапан

Б. Библиографија:

Радови и конгресна саопштења из уже научне области:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Mojic M**, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Dinic S, Grdovic N, Miljkovic D, Stosic-Grujicic S, Tumino S, Fagone P, Nicoletti F, Zocca MB, Alabed Y, McCubrey JA, Nicoletti F. Saquinavir-NO-targeted S6 protein mediates sensitivity of androgen-dependent prostate cancer cells to TRAIL. *Cell Cycle*. 2012 15;11(6). **(M21)**
2. Mihajlović LE, Savić A, Poljarević J, Vučković I, **Mojic M**, Bulatović M, Maksimović-Ivanic D, Mijatović S, Kaluđerović GN, Stošić-Grujičić S, Miljković D, Grgurić-Šipka S, Sabo TJ. Novel methylene modified cyclohexyl ethylenediamine-N,N'-diacetate ligands and their platinum(IV) complexes. Influence on biological activity. *J Inorg Biochem*. 2012 109C:40-48. **(M21)**
3. Ueno S, **Mojic M**, Ohashi Y, Higashi N, Hayakawa Y, Irimura T. Asialoglycoprotein receptor promotes cancer metastasis by activating the EGFR-ERK pathway. *Cancer Res*. 2011 71(20):6419-27. **(M21)**
4. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, **Mojic M**, Timotijevic G, Miljkovic D, Mangano K, Donia M, Di Cataldo A, Al-Abed Y, Cheng KF, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. Cytotoxic and immune-sensitizing properties of nitric oxide-modified Saquinavir in iNOS-positive human melanoma cells. *J Cell Physiol*. 2011 226(7):1803-12. **(M21)**
5. Donia M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, **Mojic M**, Miljkovic D, Timotijevic G, Fagone P, Caponnetto S, Al-Abed Y, McCubrey J, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. In vitro and in vivo anticancer action of Saquinavir-NO, a novel nitric oxide-derivative of the protease inhibitor saquinavir, on hormone resistant prostate cancer cells. *Cell Cycle*. 2011 10(3):492-9. **(M21)**

6. Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Miljkovic D, Harhaji-Trajkovic L, Timotijevic G, **Mojic M**, Dabideen D, Cheng KF, McCubrey JA, Mangano K, Al-Abed Y, Libra M, Garotta G, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. The antitumor properties of a nontoxic, nitric oxide-modified version of saquinavir are independent of Akt. *Mol Cancer Ther.* 2009 8(5):1169-78. (**M21**)
7. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, **Mojic M**, Malaponte G, Libra M, Cardile V, Miljkovic D, Harhaji L, Dabideen D, Cheng KF, Bevelacqua Y, Donia M, Garotta G, Al-Abed Y, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. Novel nitric oxide-donating compound (S,R)-3-phenyl-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid-nitric oxide (GIT-27NO) induces p53 mediated apoptosis in human A375 melanoma cells. *Nitric Oxide.* 2008 19(2):177-83. (**M22**)

B2. Радови у часописима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**

B3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M. Mojic**, D. Maksimovic-Ivanic, S. Mijatovic, D. Miljkovic, Y. Al-Abed, S. Stosic-Grujicic, F. Nicoletti. NO modified antiviral drug Saquinavir reduces metastatic potential of colon cancer cells. *Nature - CNIO cancer symposium on "Frontiers in Tumour Progression"*, 24-27 October 2010, Madrid, Spain, Abstract book, p. 175. (**M34**)
2. D. Maksimovic-Ivanic, S. Mijatovic, **M. Mojic**, G. Timotijevic, D. Miljkovic, K. Mangano, M. Donia, Y. Al-Abed, S. Stosic-Grujicic, F. Nicoletti. Different action of nitric oxide-modified forms of saquinavir and izoxazole derivate VGX-1027 in colon cancer cells. 15th World Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine, 7-9 October 2010, Loutraki, Greece, *Int J Mol Med.* Vol. 26 (Suppl. 1), p. S33 (215). (**M34**)
3. S. Mijatovic, D. Maksimovic-Ivanic, **M. Mojic**, G. Timotijevic, D. Miljkovic, K. Mangano, M. Donia, Y. Al-Abed, S. Stosic-Grujicic, F. Nicoletti. Anti-melanoma potential of nitric oxide-modified form of HIV inhibitor-saquinavir; Cell specific mode of drug action. 15th World Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine, 7-9 October 2010, Loutraki, Greece, *Int J Mol Med.* Vol. 26 (Suppl. 1), p. S33 (216). (**M34**)
4. M. Donia, D. Maksimovic-Ivanic, S. Mijatovic, **M. Mojic**, G. Timotijevic, D. Miljkovic, S. Caponnetto, P. Fagone, M. Libra, K. Mangano, S. Stosic-Grujicic, F. Nicoletti. The effects of the nitric oxide-modified HIV protease inhibitor Saquinavir-NO (Saq-NO) on p53-deficient androgen independent prostate cancer cell lines. 15th World Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine, 7-9 October 2010, Loutraki, Greece, *Int J Mol Med.* Vol. 26 (Suppl. 1), p. S69 (360). (**M34**)
5. **M. Mojic**, D. Maksimovic-Ivanic, S. Mijatovic, D. Miljkovic, Y. Al-Abed, S. Stosic-Grujicic, F. Nicoletti. Different outcome of applied nitric oxide (NO) modification on anticancer drugs action. International symposium on "One hundred years of Ivan Djaja's (Jean Giaja) Belgrade School of Physiology", 10-14 September 2010, Belgrade, Serbia,

Book of Abstracts, p. 79. (M34)

6. Mijatovic S, Timotijevic G, Miljkovic D, Radovic J, **Mojic M**, Maksimovic-Ivanic D, Dekanski D, Stosic-Grujicic S. Focused conference group: FC16 - Natural products: past and future? Composite anti-melanoma action of dry olive leaf extract. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 17-23 July 2010, Copenhagen, Denmark, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 107 (Suppl. 1), p. 152 (M34)
7. Mijatovic S, Radovic J, Timotijevic G, **Mojic M**, Miljkovic D, Dekanski D, Stosic-Grujicic S. Dry olive leaf extract promotes avant-garde apoptosis in melanoma cells; switch from caspase- dependent to caspase- independent pathway. PLANTA MEDICA. 2009;75(9): p. 903 (M34)

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **М**
2. **М**

В. Тема докторске дисертације:

Наслов дисертације:

Анализа антитуморског деловања агенаса модификованих азот моноксидом, саквинавир-NO и GIT-27NO на канцер колона *in vitro* и *in vivo*

Полазне основе:

Напредак у медицини када је у питању терапија малигнитета је симболичан и већим делом се своди на могућности благовремене дијагностике. Терапеутски успеси лекова дизајнираних са идејом да умање прогресију трансформисаних ћелија показали су се скромним. Чињеница да су сличности између малигне и нормалне ћелије ипак веће од њихових разлика имају за последицу општу токсичност ових препарата што додатно слаби могућност организма да се сам одбрани.

Како је последњих деценија науци све јаснија повезаност инфламације, инфекције и развоја малигнитета у свим његовим фазама спонтано се наметнуло и питање евентуалне ефикасности антиинфламаторних и антиинфективних агенаса у терапији канцера. Бројне научне студије су потврдиле антитуморски потенцијал ових препарата, а најдрагоценија су искуства из клиничке праксе где је употреба извесних лекова из поменутих категорија неочекивано довела до регресије тумора или пак умањила инциденцу појаве ове болести. Канцер колона је један од најјасних примера корелације стања хроничне инфламације (Кронова болест), вирусне инфекције (аденоматозни полипи) и настанка, прогресије и метастазирања тумора. Висок метастатски потенцијал овог канцера сврстава га у групу малигнитета који лоше одговарају на терапијске протоколе и не ретко се завршавају смрћу. Бројни експериментални подаци указују да нестероидни антиинфламаторни лекови поседују извесна антитуморска својства и да свој максимум остварују у хемопревенцији,

чак двостуко смањујући инциденцу појављивања канцера колона. Проблем гастротоксичности, која се јавља као нежељена последица употребе ових лекова у великој мери компромитује њихову примену. Модификација лекова из ове категорије ковалентним везивањем хемијске групе која ће донирати азот моноксид (NO, од енгл. nitric oxide) примењена је са идејом да ће отпуштени азот моноксид симулирати ефекте простагландина и допринети очувању желудачне мукозе. Поменута структурна модификација је вишеструко унапредила ефекте оригиналних лекова, умањујући им токсичност али и оснажујући њихов антитуморски потенцијал како *in vitro* тако и *in vivo*.

Директним ковалентним везивањем хемијске групе која ослобађа NO за антиинфламаторну супстанцу VGX-1027, за коју је показано да ублажава ток акутних и хроничних инфламаторних болести али да сама не поседује антитуморска својства креирана је супстанца названа GIT-27NO. Показано је да GIT-27NO смањује вијабилитет бројних ћелијских линија канцера *in vitro* и *in vivo*, индукујући ћелијску смрт апоптозом или аутофагијом, зависно од типа тумора. У основи деловања GIT-27NO је ослобађање велике количине азот моноксида али само у контакту са ћелијом и/или њеним солубилним продуктом. Велика количина ефикасно интернализованог азот моноксида узрокује ланчану реакцију генерисања нових реактивних врста кисеоника и азота, који неселективно оштећују макромолекуле туморске ћелије. Поред генерисања јаког оксидативног стреса, третман GIT-27NO резултира смањењем нивоа експресије протуморског транскрипционог фактора YY1, повећаном експресијом тумор супресора p53 и променом равнотеже про- и антиапоптотских молекула у смеру покретања програма ћелијске смрти.

Истом хемијском манипулацијом модификован је саквинавир, инхибитор протеазе хуманог вируса имунодефицијенције (ХИВ, од енгл. human immunodeficiency virus) и први одобрени лек из ове групе за лечење ХИВ позитивних пацијената и добијено је једињење означено као Saq-NO. Оригинални антиретровирални лек остварује своје антитуморско деловање инхибирајући АКТ сигнални пут, 26S јединицу протеазома и матриксне металопроотеиназе. Описани утицаји овог лека на сисарску ћелију су међутим, барем делом, узрочници његових бројних нежељених дејстава (дијабетес, кардиоваскуларне болести, липодистрофија, остеопороза). Модификација ковалентним везивањем азот моноксида је довела до настанка квалитативно новог једињења, Saq-NO, чија је токсичност према примарним ћелијама неутралисана, а иницијално антивирално својство лека очувано. У поређењу са оригиналним леком, у *in vitro* и *in vivo* условима Saq-NO је показао снажније антитуморско деловање, нарочито при нижим дозама. У основи смањења вијабилитета у случају највећег броја ћелијских линија тумора је била инхибиција пролиферације и следствена индукција диференцијације. У малом броју ћелијских линија Saq-NO је индуковао апоптозу. За разлику од других NO-модификованих агенаса, Saq-NO не отпушта мерљиве количине азот моноксида, те се његово антитуморско деловање не може приписати токсичним ефектима овог реактивног молекула.

Веома важан аспект антитуморског деловања Saq-NO је његова способност да туморске ћелије учини осетљивим на хемиотерапију али и цитотоксичну активност ћелија имунског система посредовану ТРАИЛ-ом (TRAIL од енгл. TNF related apoptosis inducing ligand). Овај феномен добија посебан значај уколико се узме у обзир да је независан од p53 статуса ћелије или нивоа експресије транспортера P-gp, MRP1 и BCRP1.

Предмет докторске дисертације:

Предмет докторске дисертације је испитивање потенцијала, а потом и механизма путем којих нова једињења, GIT-27NO и Saq-NO, редукују раст и метастатски потенцијал канцера колона хуманог и мишијег порекла у *in vitro* и *in vivo* условима, као и да врате осетљивост ћелија хуманог колона на антитуморски имунски одговор посредован TRAIL-ом.

Процена вијабилитета ћелија канцера колона након *in vitro* третмана широким опсегом доза GIT-27NO и Saq-NO вршиће се колориметријским тестом применом кристал виолет боје. Антитуморски потенцијал испитиваних супстанци биће потом евалуиран *in vivo* у моделу тумора индукованог апликацијом CT26CL25 ћелија у BALB/c мишеве. Третман модификованим једињењима ће се спровести од тренутка када се утврди присуство тумора, а њихов утицај квантификовати кроз одређивање волумена насталих тумора. Механизам антитуморског деловања ће се утврдити применом различитих тестова који треба да дају основне информације о узроку евентуалног пада вијабилитета. Обзиром да у основи антитуморске активности може бити индукција различитих типова ћелијске смрти али и инхибиција пролиферације, примениће се релевантни тестови. Застој у различитим фазама ћелијског циклуса као и присуство апоптозе у финалној фази ће се најпре детерминисати бојењем ћелија пропидијум јодидом и анализом ћелијског циклуса методом проточне цитофлуориметрије. Присуство ћелијске смрти типа 1 након третмана проучаваним агенсима биће потом утврђено двоструким бојењем анексин - пропидијум јодидом који пружа могућност мапирања ране и касне апоптозе. Учешће каспаза ће бити утврђено бојењем ћелија флуоресцентно обележеним пан-каспазним инхибитором-апостатом. Присуство про- и антиапоптотских молекула биће анализирано на нивоу експресије информационе РНК Real time PCR методом. Ћелијска смрт типа 2 позната као ћелијска смрт аутофагијом биће утврђена бојењем суправиталном акридин оранж бојом и анализом података на проточном цитофлуориметру, док ће се некроза детектовати лактат-деhidрогеназним тестом. Паралелно, пролиферативни потенцијал канцера колона третираних GIT-27NO и Saq-NO биће квантификован помоћу цитофлуориметријске анализе ћелија обојених карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидил естром (CFSE). Мерењем вијабилитета ћелија и до 72 часа по престанку третмана утврдиће се постојаност цитостатског ефекта.

Утицај GIT-27NO и Saq-NO на метастатски потенцијал канцера колона биће најпре анализиран кроз промену морфологије и просторне организације ћелија у култури у присуству компонената екстраћелијског матрикса. Након *in vitro* одређивања утицаја третмана на адхезивност, миграторну способност и инвазивност ћелија, постојаност утицаја на метастатски потенцијал биће тестиран *in vivo*, интравенским убризгавањем ћелија претходно третираних испитиваним агенсом, те анализом броја и величине плућних метастаза по завршетку експеримента. На молекуларном нивоу, имуноблотом ће се квантификовати ниво експресије антиметастатског протеина инхибитора Raf-1 киназе (РКИП од енгл. Raf-1 kinase inhibitor protein).

Будући да се канцер не може проучавати изоловано од своје микросредине која у великој утиче како на његову прогресију тако и на одговор на хемотерапију, испитиваће се способност GIT-27NO и Saq-NO да врате осетљивост ћелија канцера колона на антитуморски имунски одговор посредован ТРАИЛ молекулом.

На крају, поређењем са конвенционалним NO-донорима азот монооксида и употребом антиоксиданаса и молекула „хватача“ азот монооксида и пероксинитрита утврдиће се допринос ослобођеног NO укупном антитуморском деловању GIT-27NO и Saq-NO на моделу канцера колона.

Научни циљ докторске дисертације:

Основни циљеви овог истраживања су:

- испитивање директних и индиректних антитуморског деловања супстанци модификованих азот монооксидом, GIT-27NO и Saq-NO, на ћелијским линијама канцера колона пореклом из миша (CT26CL25) и човека (HCT116) у *in vitro* и *in vivo* условима;
- расветљавање молекуларних механизма у основи запажених ефеката са прецизирањем улоге азот монооксида у свеукупном антитуморском деловању испитиваних супстанци.

Резултати ове докторске дисертације би требало да пруже увид у допринос примењене модификације својствима тестираних агенаса GIT-27NO и Saq-NO и да сугеришу могућност њихове примене у терапији канцера колона.

Материјал и методи:

При изради докторске дисертације кандидат ће користити следеће методе:

- Гајење ћелијских линија канцера колона пореклом из миша и човека- CT26CL25 и HCT116 у стандардним условима ћелијске културе као и у присуству компонената екстраћелијског матрикса (тзв. тродимензионална ћелијска култура).
- Мерење вијабилитета адхерентних ћелија кристал виолет колориметријским тестом.
- *In vivo* утврђивање антитуморског потенцијала испитиваних супстанци на моделу канцера колона индукованог субкутаном инокулацијом CT26CL25 ћелија у сингени сој BALB/с миша.
- Анализа дистрибуције ћелија по појединим фазама ћелијског циклуса на проточном цитофлуориметру.
- Одређивање заступљености појединих типова ћелијске смрти- некрозе (детекцијом ослобађања цитосолног ензима лактат дехидрогеназе), програмиране ћелијске смрти типа 1- апоптозе (бојењем анексин-пропидијум јодидом и флуоресцентно обележеним пан-каспазним инхибитором те анализом на проточном

цитофлуориметру) и програмиране ћелијске смрти типа 2- аутофагије (бојењем суправиталном бојом акридин оранж и анализом на проточном цитофлуориметру)

- Одређивање промене експресије про- и антиапоптотских молекула на нивоу информационе РНК Real time PCR методом.
- Мерење пролиферације обележавањем ћелија карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидил естром.
- Одређивање афинитета ћелија према компонентама екстраћелијског матрикса адхезионим тестом.
- Квантификација промене миграторног потенцијала и инвазивности ћелија у одговору на хемотактични стимулус трансмиграционим есејима.
- Утврђивање постојаности антиметастатског потенцијала испитиваних супстанци убризгавањем претретираних СТ26CL25 ћелија у репну вену миша сингеног соја и следственом анализом броја и величине плућних метастаза након три недеље.
- Квантификација ослобођеног азот монооксида у супернатантима ћелија Грисовом методом.
- Квантификација количине интрацелуларног азот монооксида бојењем 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифлуорофлуоресцеин диацетатом (ДАФ-ФМ).
- Одређивање присуства реактивних врста кисеоника и азота редокс сензитивном бојом: дихидро родамин (ДХР).
- Анализа нивоа експресије антиметастатског протеина инхибитора Raf-1 киназе имуноблотом.

Најважнији литературни подаци који подржавају тему (до 10 референци):

1. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Mojic M, Timotijevic G, Miljkovic D, Mangano K, Donia M, Di Cataldo A, Al-Abed Y, Cheng KF, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. Cytotoxic and immune-sensitizing properties of nitric oxide-modified Saquinavir in iNOS-positive human melanoma cells. *J Cell Physiol.* 2011 Jul;226(7):1803-12.
2. Donia M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Mojic M, Miljkovic D, Timotijevic G, Fagone P, Caponnetto S, Al-Abed Y, McCubrey J, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. In vitro and in vivo anticancer action of Saquinavir-NO, a novel nitric oxide-derivative of the protease inhibitor saquinavir, on hormone resistant prostate cancer cells. *Cell Cycle.* 2011 Feb 1;10(3):492-9.
3. Rothweiler F, Michaelis M, Brauer P, Otte J, Weber K, Fehse B, Doerr HW, Wiese M, Kreuter J, Al-Abed Y, Nicoletti F, Cinatl J Jr. Anticancer effects of the nitric oxide-modified saquinavir derivative saquinavir-NO against multidrug-resistant cancer cells. *Neoplasia.* 2010 Dec;12(12):1023-30.
4. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Timotijevic G, Miljkovic D, Donia M, Libra M, Coco M, McCubrey J, Al-Abed Y, Korac A, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. Induction of caspase-independent apoptotic-like cell death of mouse mammary tumor TA3Ha cells in vitro and reduction of their lethality in vivo by the novel chemotherapeutic agent GIT-27NO. *Free Radic Biol Med.* 2010 Apr 15;48(8):1090-9.
5. Donia M, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Miljkovic D, Mangano K, Tumino S, Biondi A, Basile F, Al-Abed Y, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. The novel NO-donating compound GIT-27NO inhibits in vivo growth of human prostate cancer cells and prevents murine immunoinflammatory hepatitis. *Eur J Pharmacol.* 2009. 1;615(1-3):228-33.
6. Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Miljkovic D, Harhaji-Trajkovic L, Timotijevic G, Mojic M, Dabideen D, Cheng KF, McCubrey JA, Mangano K, Al-Abed Y, Libra M, Garotta G, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. The antitumor properties of a nontoxic, nitric oxide-modified version of saquinavir are independent of Akt. *Mol Cancer Ther.* 2009. 8(5):1169-78.
7. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Mojic M, Malaponte G, Libra M, Cardile V, Miljkovic D, Harhaji L, Dabideen D, Cheng KF, Bevelacqua Y, Donia M, Garotta G, Al-Abed Y, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. Novel nitric oxide-donating compound (S,R)-3-phenyl-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid-nitric oxide (GIT-27NO) induces p53 mediated apoptosis in human A375 melanoma cells. *Nitric Oxide.* 2008 Sep;19(2):177-83.
8. Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Harhaji L, Miljkovic D, Dabideen D, Fan Cheng K, Mangano K, Malaponte G, Al-Abed Y, Libra M, Garotta G, Nicoletti F, Stosic-Grujicic S. Anticancer properties of the novel nitric oxide-donating compound (S,R)-3-phenyl-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid-nitric oxide in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2008 Mar;7(3):510-20.
9. Raymond K. Yeh, Jie Chen, Jennie L. Williams, Mehdi Baluch, Thomas R. Hundley, Raphael E. Rosenbaum, Srinivas Kalala, Frank Traganos, Francesca Benardini, Piero del Soldato, Khosrow Kashfi, Basil Rigas. NO-donating nonsteroidal antiinflammatory

drugs (NSAIDs) inhibit colon cancer cell growth more potently than traditional NSAIDs: a general pharmacological property? *Biochemical Pharmacology* 2004. 67: 2197–2205

10. Benjamin Bonavida, Stavroula Baritaki, Sara Huerta-Yepez, Mario I. Vega, Devasis Chatterjee, Kam Yeung. Novel therapeutic applications of nitric oxide donors in cancer: Roles in chemo and immunosensitization to apoptosis and inhibition of metastases. *Nitric Oxide* 2008. 19: 152–157

Г. Закључак и предлог:

На основу свега изложеног може се закључити да је кандидат Марија С. Мојић за предмет своје докторске дисертације одабрала врло актуелну проблематику указујући на могућност другачијих терапеутских концепата у лечењу малигних болести. Овај приступ базиран је на апликацији лекова нецитостатског профила и њихових хемијских модалитета дизајнираних са идејом да се оригиналне супстанце квалитативно унапреде. Постојећи подаци у литератури, идејна конструкција студије и креативност у истраживачком процесу који подразумева анализу не само изоловане малигне ћелије већ и њене способности да одговара на сигнале из окружења оправдава циљеве који су овом дисертацијом постављени. Методолошки аспект дисертације стављен у службу добијања жељених података је у складу са високим научним критеријумима.

Као чланови комисије за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације **Марије С. Мојић** под насловом: “Анализа антитуморског деловања агенаса модификованих азот моноксидом, саквинавир-NO и GIT-27NO на канцер колона *in vitro* и *in vivo*”, закључујемо да је тема у потпуности научно заснована, да су предложени одговарајући приступи и методе испитивања и да се кандидату може одобрити реализација планираних испитивања.

Београд, 23. 03. 2012

Комисија:

др Сања Мијатовић, виши научни сарадник ИБИСС

др Гордана Матић, редовни професор Биолошког факултета

др Данијела Максимовић-Иванић, научни саветник ИБИСС

(Име и презиме, звање и институција члана комисије)

