

Биолошки факултет
Број захтева:50/127-1
Датум: 14. 6. 2024.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно чл. 48 ст. 5 тач. 3) Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“ бр. 201/2018, 207/2019, 213/2020, 214/2020, 217/2020, 230/21, 232/22, 233/22 и 236/22), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Улога фотореактивних деривата склареола и артемизинина у терапији и дијагностици вишеструке резистенције код ћелија глиобластома”

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биолошке науке.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља и презиме кандидата:

Ема Н. Лупшић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет Сорбона, Париз.

3. Година дипломирања: 2019.

4. Година уписа на докторске студије: 2021/2022.

Универзитет у Београду - Биолошки факултет

5. Назив студијског програма докторских студија: Молекуларна биологија, модул: Транслациона истраживања у неуробиологији и биомедицини.

6. Датум подношења пријаве теме докторске дисертације: 29. 4. 2024.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

А:

Име и презиме ментора: **др Ана Подолски-Ренић,**

Звање: научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију.

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Podolski-Renić A**, Dinić J, Stanković T, Tsakovska I, Pajeva I, Tuccinardi T, Botta L, Schenone S, Pešić M. New Therapeutic Strategy for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells with Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5308. **M21**
2. Jovanović M, Dragoj M, Zhukovsky D, Dar'in D, Krasavin M, Pešić M, **Podolski-Renić A**. Novel TrxR1 Inhibitors Show Potential for Glioma Treatment by Suppressing the Invasion and Sensitizing Glioma Cells to Chemotherapy. *Front Mol Biosci*. 2020; 7:586146. **M21**
3. Burić SS, **Podolski-Renić A**, Dinić J, Stanković T, Jovanović M, Hadžić S, Ayuso JM, Virumbrales-Muñoz M, Fernández LJ, Ochoa I, Pérez-García VM, Pešić M. Modulation of Antioxidant Potential with Coenzyme Q10 Suppressed Invasion of Temozolomide-Resistant Rat Glioma In Vitro and In Vivo. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019:3061607. **M21**
4. **Podolski-Renić A**, Banković J, Dinić J, Ríos-Luci C, Fernandes MX, Ortega N, Kovačević-Grujičić N, Martín VS, Padrón JM, Pešić M. DTA0100, dual topoisomerase II and microtubule inhibitor, evades paclitaxel resistance in P-glycoprotein overexpressing cancer cells. *Eur J Pharm Sci*. 2017;105:159-168. **M21**
5. **Podolski-Renić A**, Bősze S, Dinić J, Kocsis L, Hudecz F, Csámpai A, Pešić M. Ferrocene-cinchona hybrids with triazolyl-chalcone linkers act as pro-oxidants and sensitize human cancer cell lines to paclitaxel. *Metallomics* 2017;9(8):1132-1141. **M21**

Б:

Име и презиме ментора: **др Марија Аџић Буквић,**

Звање: научни сарадник, Универзитет у Београду – Биолошки факултет.

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Adzic Bukvic M**, Laketa D, Dragic M, Lavrnja I, Nedeljkovic N. Expression of functionally distinct ecto-5'-nucleotidase/CD73 glycovariants in reactive astrocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis and neuroinflammatory conditions in vitro. *Glia*. 2024; 72(1), 19–33. **M21**

2. Mihajlovic K, **Adzic Bukvic M**, Dragic M, Scortichini M, Jacobson KA, Nedeljkovic N. Anti-inflammatory potency of novel ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibitors in astrocyte culture model of neuroinflammation. *European Journal of Pharmacology*. 2023; 956, 175943. **M21**
3. Bijelić D, **Adžić M**, Perić M, Reiss G, Milošević M, Andjus PR, Jakovčevski I. Tenascin-C fibronectin D domain is involved in the fine-tuning of glial response to CNS injury in vitro. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022; 10. **M21**
4. Bijelić D, **Adžić M**, Perić M, Jakovčevski I, Förster E, Schachner M, Andjus PR. Different Functions of Recombinantly Expressed Domains of Tenascin-C in Glial Scar Formation. *Frontiers in Immunology*. 2021; 11, 3944. **M21**
5. **Adzic M**, Nedeljkovic, N. Unveiling the role of Ecto-5'-nucleotidase/CD73 in astrocyte migration by using pharmacological tools. *Frontiers in Pharmacology*. 2018; 9(MAR), 1–19. **M21**

Обавештамо вас да је Наставно-научно веће Универзитета у Београду-Биолошког факултета, на седници одржаној 14. 6. 2024. год. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем.
2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације.
3. Електронска верзија



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

50/127 - 14. 6. 2024.

На основу члана 96. Закона о високом образовању, члана 62. став 1. тачка 12. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета и члана 29. Правилника о докторским студијама на Универзитету у Београду-Биолошком факултету, бр: 15/276 од 07.09.2018; 15/122 од 14.06.2019.; 15/132 од 11.09.2020. године., Наставно-научно веће Факултета, на VIII редовној седници одржаној 14. 6. 2024. године, донело је

О Д Л У К У

о прихватању теме докторске дисертације и одређивању ментора

На основу Извештаја Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације прихвата се тема докторске дисертације и одређује ментор кандидату:

Еми Н. Лупшић, мастер ћелијски биолог, студијског програма докторских студија: Молекуларна биологија, модул: Транслациона истраживања у неуробиологији и биомедицини, под називом:

„Улога фотореактивних деривата склареола и артемизинина у терапији и дијагностици вишеструке резистенције код ћелија глиобластома”

За менторе се одређују:

1. др Ана Подолски-Ренић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију,
2. др Марија Ацић Буквић, научни сарадник, Универзитет у Београду – Биолошки факултет.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Доставити:

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

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 13.5.2024. године, одређени смо у Комисију за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације **Еме Н. Лупшић**, под насловом: „Испитивање фотореактивних деривата склареола и артемизинина у терапији и дијагностици вишеструке резистенције код ћелија глиобластома”.

На основу поднете документације и увида у досадашњи рад **Еме Н. Лупшић**, Комисија подноси Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографија:

Општи подаци:

Име, средње слово и презиме: Еме Н. Лупшић

Датум и место рођења: 02.02.1997, Трст (Италија)

Образовање:

- 2021–данас: Докторске студије, Модул: Физиологија-Транслациона истраживања у неуробиологији и биомедицини, Универзитет у Београду (Република Србија)
- 2019–2020: Мастер студије, Модул: Молекуларна биологија ћелије, Универзитет Сорбона (Република Француска)
- 2015–2019: Основне студије, Биолошки факултет, Универзитет у Београду (Република Србија)

Запослење:

- 2022.– истраживач приправник

Курсеви:

- COST Action IG17104 - "3D or not 3D: new solutions to recreate cancer biology in vitro", Davos
- COST Action IG17104 - "European forum - Round Table 1 - MDR from bedside to bench and back"
- COST Action IG17104 - "Pandora Cancer Academy - Advanced cellular models in oncological research"

Пројекти:

- 2023–2026: PhotoSCLART - Развој природних фотореактивних антитуморских агенаса – деривата склареола и артемизинина у моделу вишеструке резистенције туморских ћелија: основа за тераностички приступ, Програм ПРИЗМА, фонд за науку Републике Србије.
- 2022–2025: MilkIng - Биомедицински потенцијал новоизолованих дитерпена латекса млечика са станишта у Србији (*Euphorbia L.*), стратешки пројекат српске академије наука и уметности (САНУ).
- 2022–2024: TargetedResponse - Функционална дијагностика неситноћелијског карцинома плућа - нови концепт за унапређење персонализоване терапије у Србији, програм ИДЕЈЕ, фонд за науку Републике Србије.

Чланство у научним друштвима:

- Члан Федерације Европског Биохемијског Друштва (енг. FEBS) кроз Биохемијско Друштво Србије од 2022
- Члан Европског Друштва Истраживача Рака (енг. EACR) кроз Српско друштво истраживача рака од 2022
- Члан Европског друштва за Неуронауке кроз Друштво за неуронауке Србије од 2023

Страни језици:

- енглески (Ц1)
- италијански (Б2)

Посебне активности и награде: /

Б) Библиографија:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Dinić J, Podolski-Renić A, Dragoj M, Jovanović Stojanov S, Stepanović A, Lupšić E, Rajović M, Jovanović M, Petrović Rodić D, Marić D, Ercegovac M, Pešić M. Immunofluorescence-Based Assay for High-Throughput Analysis of Multidrug Resistance Markers in Non-Small Cell Lung Carcinoma Patient-Derived Cells. *Diagnostics (Basel)*. 2023; 13(24):3617. (M22)
2. Stojković, P., Kostić, A., Lupšić, E., Terzić Jovanović, N., Novaković, M., Nedialkov, P., Trendafilova, A., Pešić, M., & Opsenica, I. M. (2023). Novel hybrids of sclareol and 1,2,4-

triazolo[1,5-a]pyrimidine show collateral sensitivity in multidrug-resistant glioblastoma cells. *Bioorganic Chemistry*. 2023; 138: 106605. (M21)

3. Koračak Lj., Lupšić E., Terzić Jovanović N., Jovanović M., Novaković M. Nedialkov P., Trendafilova A., Pešić M., Opsenica I.M. (2023). Novel artesunate – pyrimidine-based hybrids with anticancer potential against multidrug-resistant cancer cells. *New J. Chem.*, 2023. 47; 6844-6855. (M22)

4. Jovanović Stojanov, S., Kostić, A., Ljuljić, M., Lupšić, E., Schenone, S., Pešić M., & Dinić, J. (2022). Autophagy Inhibition Enhances Anti-Glioblastoma Effects of Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine Tyrosine Kinase Inhibitors. *Life*. 2022; 12(10): 1503. (M21)

Б2. Радови у часописима домаћег значаја /

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у целости /

Б4. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу

1. Dinić J., Podolski-Renić A., Dragoj M., Jovanović Stojanov S., Stepanović A., **Lupšić E.**, Pajović M., Petrović Rodić D., Marić D., Ercegovac M., Pešić M. Functional diagnostics and ex-vivo screening of erlotinib and nintedanib in non-small cell lung carcinoma: Implications for multidrug resistance and personalized therapy. *ESMO Molecular Analysis for Precision Oncology Congress 2023, Paris, France, 4-6 October 2023, P34.*

2. **Lupšić E.**, Dinić J., Nikolić I., Jovanović Stojanov S., Pešić M., Podolski-Renić A. The effect of tyrosine kinase inhibitors in high-grade glioma patient-derived cells. *6th Congress of Serbian Association for Cancer Research, Belgrade, Serbia, October 2-4, 2023 p. 84.*

3. Jovanović Stojanov S., Podolski-Renić A., Dinić J., Dragoj M., Jovanović M., Stepanović A., **Lupšić E.**, Pajović M., Petrović Rodić D., Marić D., Ercegovac M., Pešić, M. High-throughput screening of multidrug-resistance markers in non-small cell lung carcinoma patient-derived cells – contribution on to personalized treatment. *6th Congress of Serbian Association for Cancer Research, Belgrade, Serbia, October 2-4, 2023 p. 37.*

4. Stepanović A., Dinić J., Podolski-Renić A., Jovanović Stojanov S., Dragoj M., Jovanović M., **Lupšić E.**, Milićević A., Glumac S., Marić D., Ercegovac M., Pešić M. Novel functional immunoassay for identification of multidrug resistance markers in non-small cell lung carcinoma patient-derived cells. *EACR 2023 Congress: Innovative Cancer Science, Torino, Italy, Jun 12-15, 2023, p. 461.*

5. Jovanović Stojanov S., Podolski-Renić A., Dinić J., Dragoj M., Jovanović M., Stepanović A., **Lupšić E.**, Bajović R., Glumac S., Marić D., Ercegovac M., Pešić M. Osimertinib is selective

against NSCLC cells and modulates the multidrug-resistant phenotype in patient-derived cell cultures and co-cultures of NSCLC cells and fibroblasts. ESMO Targeted Anticancer Therapies Congress 2023, Paris, France, 6-8 March 2023.

6. Jovanović M., Bangay G., Jovanović Stojanov S., Dragoj M., Kostić A., **Lupšić E.**, Podolski-Renić A., Dinić J., Rijo P., Pešić M. Multidrug-resistant cancer cells are sensitive to abietane diterpenoids from *Plectranthus* species. 4th International Conference on Plant Biology (23rd SPPS Meeting), Belgrade, Serbia, October 6 – 8, 2022, p. 108.

7. Jovanović M., Jovanović Stojanov S., Dragoj M., Kostić A., **Lupšić E.**, Podolski-Renić A., Dinić J., Pešić M. Anticancer effect of new carbonic anhydrase 9 inhibitors in glioblastoma cells. 3rd Symposium in Biomedicine: Basic and Clinical Neuroscience, University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, June 29, 2022, p. 19.

8. Jovanović Stojanov S., Kostić A., Ljujić M., **Lupšić E.**, Podolski-Renić A., Dragoj M., Jovanović M., Schenone S., Pešić M., Dinić J. Autophagy inhibition sensitises glioblastoma cells to Src family kinase inhibitors Si306 and its prodrug. EACR 2022: Innovative Cancer Science: Translating Biology to Medicine, Seville, Spain, June 20 – 23, 2022.

9. Kostić A., **Lupšić E.**, Stojković P., Dragoj M., Jovanović Stojanov S., Terzić-Jovanović N., Novaković M., Opsenica I.M., Pešić M. Anticancer effects of sclareol and its derivatives in glioblastoma cells. 5th Congress of SDIR: “Translational potential of cancer research in Serbia”, 3rd December 2021, Belgrade, Serbia. Abstracts books – Poster 45.

10. Kostić A., **Lupšić E.**, Nikolić A.M., Dragoj M., Jovanović Stojanov S., Novaković M., Opsenica I.M., Pešić M. Sclareol, a natural compound, inhibits P-glycoprotein activity in cancer cells. Serbian Biochemical Society Tenth Conference: “Biochemical insights into molecular mechanisms”, 24th September 2021, Kragujevac, Serbia – poster presentations, Abstracts books, pp77.

11. Kostić A., **Lupšić E.**, Nikolić A.M., Dragoj M., Jovanović Stojanov S., Novaković M., Opsenica I.M., Pešić M. Natural compound - sclareol increases doxorubicin activity and accumulation exclusively in glioblastoma cells. 4th Annual Conference COST Action 17104 STRATAGEM – “New Diagnostic and Therapeutic Tools against Multidrug Resistant Tumours”. 6th -8th September 2021, Prague, Czech Republic. Abstracts book– Poster 17.

12. **Lupšić E.**, Kostić A., Nikolić A.M., Dragoj M., Jovanović Stojanov S., Novaković M., Opsenica I.M., Pešić M. Sclareol, a fragrant natural compound, suppresses P-glycoprotein activity and sensitizes resistant cancer cells to doxorubicin, 4th Annual Conference COST Action 17104 STRATAGEM – “New Diagnostic and Therapeutic Tools against Multidrug Resistant Tumours”. 6th -8th September 2021, Prague, Czech Republic. Abstracts book – Poster 18.

Б5. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Stepanović A., **Lupšić E.**, Dinić J., Podolski-Renić A., Pajović M., Jovanović Stojanov S., Dragoj M., Terzić Jovanović N., Opsenica I., Pešić M. New anti-glioblastoma strategy with natural compounds sclareol and doxorubicin. 8th Congress of Serbian neuroscience society, Belgrade, Serbia, May 31 - Jun 2, 2023, p. 71.
2. **Lupšić E.**, Kostić A., Stojković P., Terzić-Jovanović N., Novaković M., Nedialkov P., Trendafilova A., Opsenica I.M., Pešić M. Evading multidrug resistance in glioblastoma with natural compound sclareol and its novel derivatives. 8th Congress of Serbian neuroscience society, Belgrade, Serbia, May 31 - Jun 2, 2023, p. 72.
3. Stojković P., Kostić A., **Lupšić E.**, Terzić Jovanović N., Novaković M., Pešić M., Opsenica I. M. Sinteza i citotoksičnost novih derivata sklareola. 59. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, Srbija, Jun 1 – 2, 2023, p. 77.
4. Jovanović Stojanov S., Kostić A., Ljuljić M., **Lupšić E.**, Dragoj M., Jovanović M., Pešić M, Dinić J. Inhibicija autofagije senzitivizuje ćelije glioblastoma na inhibitore Srce tirozin-kinaze, derivate pirazolo[3,4-d]pirimidina Si306 i pro-Si306. Treći kongres biologa Srbije, Zlatibor, Srbija, Septembar 21 – 25, 2022, p. 330.
5. Jovanović M., Jovanović Stojanov S., Dragoj M., Kostić A., **Lupšić E.**, Podolski-Renić A., Dinić J., Pešić M. Anti-tumorski efekat inhibitora ugenjične anhidraze – derivate kumarina na ćelijama tumora pluća. Treći kongres biologa Srbije, Zlatibor, Srbija, Septembar 21 – 25, 2022, p. 318.

В. Тема докторске дисертације:

Наслов дисертације:

На основу предлога Већа докторских студија Комисија подноси Извештај под измењеним насловом „Улога фотореактивних деривата склареола и артемизинина у терапији и дијагностици вишеструке резистенције код ћелија глиобластома”

Полазне основе:

Кандидаткиња је према увиду Комисије врло темељно дефинисала полазне основе за своје истраживање. Прво се осврнула на тешко обољење - глиобластом као најмалигнију врсту тумора мозга. Затим је појаснила да за ово обољење не постоји адекватна терапија која би значајно продужила живот пацијената.

Глиобластоми (ГБМ) представљају најчешћи и најагресивнији тип тумора мозга. Глиобластома карактеришу геномска нестабилност, неконтролисана ћелијска пролиферација и инвазивност, који доводе до настанка њихове агресивне природе. При стандардној терапији ГБМ примењује се Ступов протокол (1) који укључује хируршку ресекцију са циљем максималног уклањања тумора, праћену радиотерапијом и истовременом терапијом темозоломидом. Међутим, упркос примени терапије преживљавање пацијената у просеку износи свега 14 месеци након дијагнозе (1).

Даље је као полазну основу за своја истраживања навела вишеструку резистенцију која представља главну препреку за ефикасно лечење глиобластома. У овом делу, кандидаткиња је представила и класичан механизам резистенције на хемиотерапију посредством мембранских транспортера. Такође, кандидаткиња је указала и на фотосензитивну терапију као приступ који селективно циља резистентну популацију у оквиру тумора.

Ефикасност терапије глиобластома ограничена је и постојањем резистенције на лекове. Резистенција на велики број структурно и функционално различитих хемиотерапеутика окарактерисана је као вишеструка резистенција на лекове (енгл. „multidrug resistance“, MDR). Један од главних механизма вишеструке резистенције на лекове је повећана експресија мембранских протеина из породице АТФ везујућих транспортера – АБЦ (енгл. „ATP-binding cassette“- АБС) који су задужени за ефлукс различитих ћелијских метаболита, лиганата, као и лекова. АБЦБ1 протеин, такође познат као П-гликопротеин, један је од најбоље окарактерисаних АБЦ транспортера (2). Овај протеин је посебно значајан у органским баријерама као што су крвно-мозгана баријера и плацентна, где спречава улазак токсичних супстанци у виталне органе и ткива. На мембранама туморских ћелија присуство П-гликопротеина доводи до смањене акумулације лекова унутар ћелија и самим тим и смањене ефикасности терапије. Једна од главних карактеристика П-гликопротеина представља његова широка супстратна специфичност, те је развој антитуморских лекова који могу модулисати рад П-гликопротеина од изузетна важности (2).

Осим вишеструке резистенције на лекове, терапија је значајно ограничена и хетерогеношћу тумора, како између различитих пацијената (интер-туморска хетерогеност), тако и у оквиру једне туморске масе која поседује више различитих популација (интра-туморска хетерогеност). Велика хетерогеност отежава детекцију резистентних популација тумора и њихову ерадикацију. Додатно, хемиотерапеутици који се користе стандардно у терапији различитих тумора одликују се недостатком селективности, те осим брзо пролиферишућих ћелија тумора доводе и до нежељених ефеката на околно здраво ткиво. Развој антитуморских агенаса који селективно циљају, како туморске ћелије, тако и резистентну популацију у оквиру високо хетерогених тумора представљају један од највећих изазова у напретку терапије малигних тумора.

Тераностички приступ, који комбинује терапију и дијагностику, пружа решење за превазилажење овог проблема. Један од таквих приступа је фотосензитивна терапија, која

представља клинички одобрену, минимално инвазивну терапијску процедуру. Основни принцип подразумева администрацију једињења у свом неактивном облику, након чега следи селективна активација уз помоћ светлости у циљаним ћелијама, испољавајући селективну цитотоксичност према ћелијама тумора. Photofrin® је први клинички одобрен фотосензитивни лек за третман тумора, док је велики број лекова тренутно у фази пре-клиничких или клиничких испитивања (3). Истраживања показују да фотосензитивна терапија има потенцијал при лечењу различитих врста тумора, укључујући малигне туморе коже, плућа, главе и врата (4).

Затим се кандидаткиња осврнула на природне супстанце као значајна антитуморка једињења способна да превазиђу фенотип вишеструке резистенције.

Природни извори представљају богат резервоар биоактивних супстанци. Процењено је да је у периоду од 1981. до 2019. године чак 25% одобрених антитуморских лекова било пореклом из природних извора (5).

Артемизинин је сесквитерпенски лактон изолован из биљке *Artemisia annua* (слатки пелин), која се већ вековима користи у традиционалној кинеској медицини. Поред најпознатијег дејства артемизинина као антималарика, велики број истраживања је показао да артемизинин и његови деривати поседују антитуморску активност у *in vitro* и *in vivo* условима. Поред тога, неки деривати артемизинина су ушли у I и II фазу клиничких испитивања за терапију малигнух тумора. Главни механизми деловања ових једињења укључују продукцију реактивних кисеоничних врста, индукцију апоптозе и инхибицију ангиогенезе (6). Такође, бројни деривати артемизинина показали су се и као добри инхибитори П-гликопротеина и показали ефекат колатералне сензитивности (већа ефикасности при елеминисању туморских ћелија са фенотипом вишеструке резистенције на лекове), указујући на потенцијал ових једињења за развој антитуморских лекова (7).

Склареол је биоактивни дитерпен лабданског типа, изолован из цветова биљке *Salvia sclarea* L. (мускатна жалфија). *In vitro* истраживања показала су да склареол поседује антипролиферативно дејство ка ћелијама карцинома дебелог црева, плућа, грлића материце и остеосаркома. Најћешћи механизми деловања укључују заустављање ћелијског циклуса у G0/G1 фази, индукцију апоптозе и утицаја на промену мембранског потенцијала (8).

У лабораторији за молекуларну неуро-онкологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” добијени су прелиминарни резултати скрининга структурно различитих деривата артемизинина и склареола. Ови деривати тестирани су у *in vitro* условима на хуманим ћелијама глиобластома (деривати склареола) и неситноћелијског карцинома плућа (деривати артемизинина). Из библиотеке хемијских једињења издвојила су се једињења са погодним антитуморским ефектом на туморским ћелијама. Наиме, показано је да ови деривати склареола и артемизинина имају већу

цитотоксичност и бољу селективност ка туморским ћелијама, као и већи потенцијал да инхибирају П-гликопротеин у односу на парентална једињења (9,10).

Истовремена терапија и дијагностика резистентних ћелија глиобластома помоћу једињења испирисаних природним производима до сада није испитивана. На основу претходно објављених резултата (9,10) и на основу претраге доступне литературе, постоји основ да би фотосензитивни коњугати флуоресцентне флуорофоре и деривата природних производа артемизинина и склареола могли остварити потенцијал као тераностички алат. Овакав приступ отворио би пут за примену природних производа као фотофармаколошких и фотодијагностичких алата за третман и детекцију резистентних популација глиобластома.

Предмет докторске дисертације

Предмет истраживања је адекватно постављен на основу изнетих полазних основа: Предмет предложене докторске дисертације је проучавање потенцијала нових фотореактивних деривата склареола и артемизинина у истовременој терапији и дијагностици резистентних хуманих ћелија глиобластома.

У сарадњи са Универзитетом у Београду – Хемијским факултетом, а под руководством проф. Игора Опсенице, планирана је синтеза нових деривата склареола и артемизинина, са идејом побољшања антитуморске активности и селективности ка туморским ћелијама, посебно ка ћелијама са резистентним фенотипом. Синтеза нових серија деривата склареола биће посебно усмерена ка побољшању активности и селективности. У почетној фази дериват склареола са алдехидном функционалном групом биће добијен паладијум(II)-катализованом оксидативном Хековом реакцијом. Добијени дериват склареола ће бити преведен у одговарајуће аminer реакцијом редуктивног аминовања, који ће потом бити дериватизовани до одговарајућих коњугата са адамантанским, арил-уреа, бензил-уреа и карбаматанским групама. Синтеза деривата артемизинина укључује повезивање деривата артесунатске киселине и пиримидина коришћењем различитих линкера. Такође ће бити синтетисани хибридни артемизинински деривати који садрже триазолни прстен, добијен 1,3-диполарном реакцијом циклоадиције, као бочни ланац у линкеру између артесунске киселине и пиримидина.

Деривати склареола и артемизинина са најбољим биоактивним профилем биће повезани са фотоактивирајућим флуоресцентним бојама, путем фотолабилних линкер група (*o*-нитробензил-, *p*-азидобензил- и *o*-хидроксицинамил-групама).

Испитивања антитуморског ефекта планирана су у појединачним културама комерцијално доступних хуманих ћелија глиобластома, као и у одговарајућим нормалним ћелијским линијама. Селективност фотореактивних једињења ка ћелијама тумора биће

тестирана у ко-културама хуманих ћелијских линија глиобластома (U87) и нормалне ћелијске линије фибробласта плућа (MRC-5), док ће селективност фотореактивних једињења ка резистентном фенотипу бити тестирана у ко-културама сензитивних и резистентних ћелија глиобластома (U87, U87-TxR). У оквиру докторске дисертације биће обухваћена следећа испитивања ћелијских и молекуларних механизма:

- 1) Одређивање типа антитуморског ефекта нових деривата склареола и артемизинина (цитотоксични, цитостатски или антипролиферативни)
- 2) Дејство деривата склареола и артемизинина на прогресију ћелијског циклуса, индукцију апоптозе, аутофагије и сенесценције.
- 3) Дејство деривата склареола и артемизинина на инхибицију АБЦБ1 транспортера и акумулацију његових супстрата у ћелији
- 4) Утврђивање утицаја деривата склареола и артемизинина на продукцију реактивних кисеоничних врста, азотних врста и њиховог утицаја на мембрански митохондријални потенцијал
- 5) Утицај деривата склареола и артемизинина на антиметастатски потенцијал (ћелијску инвазију и миграцију).
- 6) Процена ефекта комбинованог третмана деривата склареола и артемизинина са хемиотерапеутицима
- 7) Евалуација дијагностичког потенцијала антитуморских флуоресцентних деривата склареола и артемизинина

Кандидаткиња је навела следеће основне хипотезе својих истраживања:

- Деривати склареола и артемизинина имају способност да селективно циљају резистентне ћелије глиобластома
- Регулација оксидативног стреса је у основи селективности ка резистентним ћелијама глиобластома
- Деривати артемизинина и склареола, самостално и у комбинацији са другим лековима представљају корисне антитуморске агенсе
- Деривати артемизинина и склареола представљају добар алат за детекцију резистентних ћелија глиобластома

Научни циљ истраживања

Циљ истраживања је реалан и остварив у периоду предвиђеном за реализацију докторске дисертације, а одражава како полазне основе, тако и предмет предложених истраживања.

Циљ овог истраживања представља одабир деривата склареола и артемизинина са оптималним анти туморским карактеристикама за формирање фотореактивних деривата који ће се селективно ослобађати у резистентним туморским ћелијама при излагању светлости из видљивог дела спектра – потенцијал истовременог коришћења у детекцији и терапији (тераностички приступ).

За постизање наведеног научног циља биће спроведено тестирање библиотеке хемијских једињења, при чему ће за даља истраживања бити одабрана једињења која поседују високу селективност према туморским ћелијама, као и способност за превазилажење резистенције код ћелија глиобластома. Посебна пажња биће посвећена проучавању молекуларних и ћелијских механизма деловања одабраних деривата, као и евалуацији дијагностичког потенцијала анти туморских флуоресцентних деривата.

Материјал и методе који се користе

Представљена методологија и ћелијски модели су у складу са предложеним предметом и циљем истраживања.

За потребе свеобухватног тестирања нових деривата склареола и артемизинина користиће се хумане ћелијске линије глиобластома (U87, A-172), резистентна ћелијска линија глиобластома са експресијом П-гликопротеина (U87-TxR), као и нормалне ћелијске линије глијалног порекла (SVG p12, CCF-STTG1) и фибробласта плућа (MRC-5). Одабране ћелијске линије биће култивисане у одговарајућим медијумима и условима погодним за њихов раст (5% CO₂, 37 °C). Ефекат деривата склареола и артемизинина на вијабилност ћелијских линија испитаће се помоћу колориметријског теста ћелијске метаболичке активности (MTT тест). Најпотентнији деривати одабраће се на основу селективности према туморским ћелијама, као и способности за превазилажење резистенције. Тип анти туморског ефекта одабраних кандидата биће одређен праћеном раста у реалном времену помоћу „xCELLigence Real-Time Cell“ система. Испитивање ћелијске смрти извршиће се двојним анексин-V/пропидиум-јодид бојењем на проточном цитометру, док ће се детекција аутофагних ћелија испитати енгл. „acridin orange“ бојењем. За детекцију сенесценције ћелија користиће се флуоресцентно обележена бета-галактозидаза (енгл. FDG). Као референтне супстанце користиће се цисплатин за индукцију апоптозе, доксорубицин за индукцију некрозе, вистусертиб за покретање

аутофагије и етопосид за индукцију сенесценције. Ефекат на дистрибуцију ћелијског циклуса биће испитана применом бојења ДНК молекула пропидиум-јодидом на проточном цитометру. Приликом анализе промена у концентрацији реактивних кисеоничних и азотних врста користиће се флуоресцентно бојење дихидроетидијумом и дихидророматином 123 на проточном цитометру и флуоресцентном микроскопу, док ће се промене у митохондријалном потенцијалу детектовати употребом катјонске боје енгл. „JC-1”. Детекција дволанчаних прекида ДНК молекула испитаће се применом анти-фосфохистон H2A.X(Ser139) антитела које се специфично везује за фосфорилисану форму H2A.X хистона. Да би одредили промене унутарћелијске рН вредности, интензитет флуоресценце рН-осетљиве радиометријске енгл. „VCECF-AM“ боје биће измерен на мултимодалном читачу плоча (BioTek Synergy H1 Multimode). Приликом испитивања антиметастатског потенцијала супстанци користиће се есеј зарастања рана, тест деградације желатина као и тест инвазије кроз матригел. Способност деривата склареола и артемизинина да инхибирају активност АБЦБ1 транспортера биће одређена на основу акумулације његових супстрата (Родамина 123 и енгл. „Oregon Green™ 488 Taxol“) проточном цитометријом и флуоресцентном микроскопијом. МТТ тестом анализираће се природа интеракције (синергизам, антагонизам, или адитивни ефекат) одабраних супстанци са хемиотерапеутицима. Дијагностички потенцијал антитуморских флуоресцентних деривата испитаће се у ко-културама U87-TxR и U87, као и ко-културама U87 и MRC-5 у односу 1:1. Третман од 3 сата представљао би оптимално време за пролазак фотореактивних деривата у ћелију, након чега би ко-културе биле изложене плавој лампи (470 nm, 3.2 mW/cm²) током 10 мин. Излагањем фотосензитивних деривата светлости из видљивог дела спектра долази до прекида фотосензитивне везе, те се флуорофора и биоактивни молекули раздвајају. Ефекат ослобођених биоактивних молекула након инкубације 24, 48 и 72 сати биће тестиран МТТ тестом. Како би у ко-културама U87 и MRC-5 разликовали ћелије глиобластома од нормалних ћелија, биће примењено имунофлуоресцентно бојење анти-глијалним киселим фибриларним протеином - ГФАП (енгл. „Glial Fibrillary Acidic Protein“ – GFAP) које специфично боји ћелије глијалног порекла. На овај начин разликоваће се нормалне (ГФАП–негативне) од туморских (ГФАП–позитивних) ћелија. Да би разликовали U87-TxR и U87 у ко-културама користиће се бојење анти-АБЦБ1 антителом, где су сензитивне ћелије АБЦБ1–негативне, а резистентне ћелије АБЦБ1–позитивне. Детектовањем активираних флуорофоре, биће одређена селективна изложеност како туморских, тако и резистентних ћелија флуоресцентним коњугатима. За анализу ће се користити аутоматско сликавање ћелија помоћу „Molecular Devices’ ImageXpress PICO EC high-content imager“.

Очекивани резултати и научни допринос

У складу са постављеним хипотезама и циљем истраживања, приликом израде докторске дисертације очекују се следећи резултати:

- Повећање селективности нових деривата склареола и артемизинина ка ћелијама тумора у односу на њихова парентална једињења
- Боља ефикасност нових деривата склареола и артемизинина у превазилажењу вишеструке резистенције на лекове у ћелијама глиобластома
- Утврђивање механизма путем којег одабрани деривати склареола и артемизинина остварују селективност ка резистентним ћелијама глиобластома
- Реверзија резистенције на хемиотерапеутике у комбинацији са одабраним дериватима склареола и артемизинина код резистентних ћелија глиобластома
- Потврда да се флуоресцентни деривати могу користити за детекцију популације резистентних ћелија

У предложеној дисертацији очекује се одабир неколико новосинтетисаних деривата склареола и артемизинина који имају бољу ефикасност у превазилажењу вишеструке резистенције на лекове у ћелијама глиобластома. Даље се очекује да се антитуморски фотореактивни деривати селективно ослобађају у резистентним туморским ћелијама указујући на њихов потенцијал истовременог коришћења у детекцији и терапији (тераностички приступ). Очекивани резултати који су изнети у овој дисертацији могу довести до комерцијализације новосинтетисаних деривата склареола и артемизинина, увођења у клиничке студије и помака у терапији глиобластома.

Најважнији литературни подаци који подржавају тему (до 10 референци)

1. Janjua TI, Rewatkar P, Ahmed-Cox A, et al. Frontiers in the treatment of glioblastoma: Past, present and emerging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;171:108-138. doi:10.1016/j.addr.2021.01.012
2. Cao Y, Shi Y, Cai Y, Hong Z, Chai Y. The Effects of Traditional Chinese Medicine on P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance and Approaches for Studying the Herb-P-Glycoprotein Interactions. *Drug Metab Dispos.* 2020;48(10):972-979. doi:10.1124/dmd.120.000050
3. Baskaran R, Lee J, Yang SG. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater Res.* 2018;22:25. Published 2018 Sep 26. doi:10.1186/s40824-018-0140-z
4. Li X, Lovell JF, Yoon J, Chen X. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(11):657-674. doi:10.1038/s41571-020-0410-2
5. Huang M, Lu JJ, Ding J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Nat Prod Bioprospect.* 2021;11(1):5-13. doi:10.1007/s13659-020-00293-7
6. Kiani BH, Kayani WK, Khayam AU, Dilshad E, Ismail H, Mirza B. Artemisinin and its derivatives: a promising cancer therapy. *Mol Biol Rep.* 2020;47(8):6321-6336.

doi:10.1007/s11033-020-05669-z

7. Wang Y, Li Y, Shang D, Efferth T. Interactions between artemisinin derivatives and P-glycoprotein. *Phytomedicine*. 2019;60:152998. doi:10.1016/j.phymed.2019.152998
8. Zhou J, Xie X, Tang H, Peng C, Peng F. The bioactivities of sclareol: A mini review. *Front Pharmacol*. 2022;13:1014105. Published 2022 Oct 3. doi:10.3389/fphar.2022.1014105
9. Stojković P, Kostić A, Lupšić E, et al. Novel hybrids of sclareol and 1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine show collateral sensitivity in multidrug-resistant glioblastoma cells. *Bioorg Chem*. 2023;138:106605. doi:10.1016/j.bioorg.2023.106605
10. Koračak, L., Lupšić, E., Jovanović, N. T., Jovanović, M., Novakovic, M., Nedialkov, P., ... & Opsenica, I. M. (2023). Novel artesunate–pyrimidine-based hybrids with anticancer potential against multidrug-resistant cancer cells. *New Journal of Chemistry*, 47(14), 6844-6855.

Г. Закључак и предлог:

На основу увида у предложена истраживања, Комисија утврђује да је предложена тема научно заснована и веома актуелна, док би очекивани резултати представљали значајан научни допринос у области проналажења ефикаснијих стратегија за лечење глиобластома.

У складу са Законом о високом образовању и Статутом Универзитета у Београду - Биолошког факултета, а имајући у виду наведено, сматрамо да кандидаткиња испуњава све потребне услове за одобрење израде докторске дисертације, те Комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета да кандидаткињи Еми Н. Лупшић, мастер биологу, одобри израду докторске дисертације под насловом: **„Улога фотореактивних деривата склареола и артемизинина у терапији и дијагностици вишеструке резистенције код ћелија глиобластома”**.

Комисија за менторе предлаже др Ану Подолски-Ренић, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду и др Марију Ацић Буквић, научног сарадника Биолошког факултета, Универзитета у Београду. Списак радова предложених ментора који квалификују менторе за вођење докторске дисертације дат је у Додатку уз Образац 3 овог извештаја.

Београд, 10.06.2024.

Комисија:

др Милица Пешић, научни саветник,
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ –
Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

др Игор М. Опсеница, редовни професор,
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Марија Ацић Буквић, научни сарадник,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет