

Биолошки факултет  
Број захтева:50/134-1  
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:

**„Потенцијал бета-глюкана за смањење и реверзију резистенције ћелија глиобластома”**

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биолошке науке.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља и презиме кандидата:

**Милица М. Пајовић**

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

Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

3. Година дипломирања: 2020.

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.

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

## ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

### А:

Име и презиме ментора: **др Миодраг Драгој,**

Звање: научни сарадник, 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. **Dragoj, M.**, Stojkovska, J., Stanković, T., Dinić, J., Podolski-Renić, A., Obradović, B., & Pešić, M. (2021). Development and Validation of a Long-Term 3D Glioblastoma Cell Culture in Alginate Microfibers as a Novel Bio-Mimicking Model System for Preclinical Drug Testing. *Brain sciences*, 11(8), 1025. <https://doi.org/10.3390/brainsci11081025>
2. **Dragoj, M.**, Stojkovska, J., Jovanović Stojanov, S., Obradović, B., Pešić, M. (2022). A 3D Biomimetic System for Testing Anticancer Drug Sensitivity. *Methods Mol Biol.*, 2535:1-9. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2513-2>
3. Stanković, T., Ranđelović, T., **Dragoj, M.**, Stojković Burić, S., Fernández, L., Ochoa, I., Pérez-García, V. M., & Pešić, M. (2021). In vitro biomimetic models for glioblastoma-a promising tool for drug response studies. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 55, 100753. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2021.100753>
4. Segura-Collar, B., Jiménez-Sánchez, J., Gargini, R., **Dragoj, M.**, Sepúlveda-Sánchez, J. M., Pešić, M., Ramírez, M. A., Ayala-Hernández, L. E., Sánchez-Gómez, P., & Pérez-García, V. M. (2022). On optimal temozolomide scheduling for slowly growing glioblastomas. *Neuro-oncology advances*, 4(1), vdac155. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdac155>
5. **Dragoj, M.**, Milosevic, Z., Bankovic, J., Tanic, N., Pesic, M., Stankovic, T. (2017). Targeting CXCR4 and FAK reverses doxorubicin resistance and suppresses invasion in non-small cell lung carcinoma. *Cell Oncol (Dordr)*, 40(1):47-62. <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0304-6>

### Б:

Име и презиме ментора: **др Надежда Недељковић,**

Звање: редовни професор, 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 Jan;72(1):19-33. doi: 10.1002/glia.24459.

2. Mihajlovic K, Bukvic MA, Dragic M, Scortichini M, Jacobson KA, **Nedeljkovic N**. Anti-inflammatory potency of novel ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibitors in astrocyte culture model of neuroinflammation. *Eur J Pharmacol*. 2023 Oct 5;956:175943. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175943.
3. Dragic M, Mihajlovic K, Adzic M, Jakovljevic M, Kontic MZ, Mitrović N, Laketa D, Lavrnja I, Kipp M, Grković I, **Nedeljkovic N**. Expression of Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 2 (NTPDase2) Is Negatively Regulated Under Neuroinflammatory Conditions *In Vivo* and *In Vitro*. *ASN Neuro*. 2022 Jan-Dec;14:17590914221102068. doi: 10.1177/17590914221102068.
4. **Nedeljkovic N**. Complex regulation of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and A<sub>2A</sub>R-mediated adenosine signaling at neurovascular unit: A link between acute and chronic neuroinflammation. *Pharmacol Res*. 2019 Jun;144:99-115. doi: 10.1016/j.phrs.2019.04.007.
5. Adzic M, **Nedeljkovic N**. Unveiling the Role of Ecto-5'-Nucleotidase/CD73 in Astrocyte Migration by Using Pharmacological Tools. *Front Pharmacol*. 2018 Mar 1;9:153. doi: 10.3389/fphar.2018.00153.

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
4. Потврда Етичке комисије



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

50/134 - 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:

**Милица М. Пајовић**, мастер биолог, студијског програма докторских студија: Молекуларна биологија, модул: Транслациона истраживања у неуробиологији и биомедицини, под називом:

**„Потенцијал бета-глюкана за смањење и реверзију резистенције ћелија глиобластома”**

За менторе се одређују:

1. др Миодраг Драгој, научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију,
2. др Надежда Недељковић, редовни професор, 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 13.05.2024. године, одређени смо у Комисију за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације **Милице М. Пајовић**, под насловом: „Потенцијал бета-гљукана за смањење и реверзију резистенције ћелија глиобластома”.

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

### ИЗВЕШТАЈ

#### **А. Биографија:**

##### **Општи подаци:**

Име, средње слово и презиме: Милица М. Пајовић

Датум и место рођења: 1.10.1997, Нови Пазар

##### **Образовање:**

2021: Докторске академске студије, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Модул: Физиологија, подмодул: Транслациона истраживања у неуробиологији и биомедицини

2020-2021: Мастер академске студије, Биолошки факултет, Универзитет у Београду,

Модул: Неуробиологија

2016-2020: Основне академске студије, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Модул: Молекуларна биологија и физиологија

##### **Запослење:**

2023: истраживач приправник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

2022-2023: истраживач приправник, Институт за нуклеарне науке „Винча“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

##### **Пројекти:**

2023-2024: Доказ концепта: Иновативна хибридна једињења склареола и доксорубицина као нова антитуморска стратегија у терапији глиобластома (*SCLarDOXInn*)

##### **Чланство у научним друштвима:**

Српско друштво истраживача рака (СДИР)

*European Association for Cancer Research* (EACR)

Друштво за неуронауке Србије (ДНС)  
*Federation of European Neuroscience Societies (FENS)*  
Српско биохемијско друштво (БДС)  
*European Society for Medical Oncology (ESMO)*  
Srpsko društvo za ekstracelularne vezikule (SrbEVs)

**Страни језици:**

енглески, немачки, руски

**Б) Библиографија:**

**Б1. Радови у часописима међународног значаја**

1. Jovanović Stojanov, S., Ntungwe, E. N., Dinić, J., Podolski-Renić, A., **Pajović, M.**, Rijo, P., & Pešić, M. (2023). Coleon U, Isolated from *Plectranthus mutabilis* Codd., Decreases P-Glycoprotein Activity Due to Mitochondrial Inhibition. *Pharmaceutics*, 15(7), 1942. **(M21)**
2. Dinić, J., Podolski-Renić, A., Dragoj, M., Jovanović Stojanov, S., Stepanović, A., Lupšić, E., **Pajović, M.**, Jovanović, M., Petrović Rodić, D., Marić, D., Ercegovac, M., & Pešić, M. (2023). Immunofluorescence-Based Assay for High-Throughput Analysis of Multidrug Resistance Markers in Non-Small Cell Lung Carcinoma Patient-Derived Cells. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 13(24), 3617. **(M21)**

**Б2. Радови у часописима домаћег значаја**

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

1. Jovanović Stojanov, S., Podolski-Renić, A., Dinić, J., Dragoj, M., Jovanović, M., Stepanović, A., Lupšić, E., **Pajović, M.**, ... & Pešić, M. (2023). High-throughput screening of multidrug-resistance markers in non-small cell lung carcinoma patient-derived cells-contribution to personalized treatment. In *Proceedings book of The Sixth Congress of The Serbian Association for Cancer Research with international participation: From Collaboration to Innovation in Cancer Research; 2023 Oct 2-4; Belgrade, Serbia* (pp. 37-39). Belgrade: Serbian Association for Cancer Research Belgrade, Serbia.

**Б4. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу**

1. **Pajović, M.**, Stanković Jeremić, J., Jovanović Stojanov, S., Gođevac, D., Pešić, M., & Podolski-Renić, A. (2023). The anticancer effects of triterpene saponin deglucocyclamine isolated from *Cyclamen hederifolium*. In *Proceedings book of The Sixth Congress of The Serbian Association for Cancer Research with international participation: From Collaboration to Innovation in Cancer Research; 2023 Oct 2-4; Belgrade, Serbia* (p. 61). Belgrade: Serbian Association for Cancer Research.
2. Dinić, J., Podolski-Renić, A., Dragoj, M., Jovanović Stojanov, S., Stepanović, A., Lupšić, E., **Pajović, M.**, ... & Pešić, M. (2023). Functional diagnostics and ex-vivo screening

of erlotinib and nintedanib in non-small cell lung carcinoma: Implications for multidrug resistance and personalized therapy. In Abstract book: Molecular Analysis for Precision Oncology Congress 2023; 2023 Oct 4-6; Paris, France (pp. 12-12). Elsevier Inc

Б5. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Stepanović, A., Lupšić, E., Dinić, J., Podolski-Renić, A., **Pajović, M.**, Jovanović Stojanov, S., ... & Pešić, M. (2023). New anti-glioblastoma strategy with natural compounds sclareol and doxorubicin. In Book of abstracts-8th Congress of Serbian neuroscience society with international participation; 2023 May 31-Jun 2; Belgrade, Serbia (p. 71). Belgrade: Serbian Neuroscience Society.

## **В. Тема докторске дисертације:**

### **Наслов дисертације:**

**„Потенцијал бета-глюкана за смањење и реверзију резистенције ћелија глиобластома”**

### **Полазне основе**

Кандидаткиња је у образложењу теме темељно описала полазне основе истраживања планираних у оквиру ове докторске тезе. Указавши на изразиту агресивност глиобластома и неефикасност хемиотерапеутика који се користи у лечењу овог малигног обољења мозга, појаснила је због чега је овај глиобластом у фокусу бројних истраживања. Просечно преживљавање пацијената са глиобластомом је око 14 месеци, а темозоломид, једини лек избора у првој линији терапије глиобластома, уз радиотерапију продужава живот пацијената за само два и по месеца у односу на примену саме радиотерапије (1). Слаба ефикасност темозоломида потиче од његове ниске биорасположивости. У физиолошким условима рН, темозоломид се разлаже на метаболите, од којих је само метилдиазонијум јон активан. Имајући у виду његову слабу растворљивост у воду и ограничену апсорптивност у цревима, процењује се да је биорасположивост темозоломида око 20-30% иницијалне дозе. У предлогу теме је описан и значај ензима O<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК метилтрансферазе (МГМТ) у развоју резистенције на темозоломид. Овај ензим поправља оштећења на ДНК молекулу настала дејством темозоломида (2).

Кандидаткиња је потом нагласила клинички значај феномена вишеструке резистенције туморских ћелија, који је једна од главних препрека у лечењу тумора. Вишеструка резистенција подразумева истовремену резистенцију на више структурно и функционално различитих хемиотерапеутика. Туморске ћелије могу бити природно резистентне или могу стећи резистенцију под селективним притиском услед хемио- или радиотерапије. У основи вишеструке резистенције на терапеутике је смањење акумулације лека у ћелијама, услед повећане експресије једне класе транспортних

аденозинтрифосфатаза, *ATP-binding cassette* (ABC ATPaze), које користе енергију хидролизе АТР за избацивање ксенобиотика из ћелије (3). Најбоље описани ABC транспортери су ABCB1 (P-гликопротеин), ABCG2 (енгл. *breast cancer resistance protein*, BCRP) и ABCC1 (енгл. *multidrug resistance-associated protein 1*, MRP1). Због непропустљивости крвно-мождане баријере (КМБ) и вишеструке резистенције онемогућена је примена доксорубицина код пацијената оболелих од глиобластома. Доксорубицин је најчешће коришћени хемиотерапеутик у клиничкој пракси, који испољава значајан цитотоксични ефекат на ћелије глиобластома *in vitro*. У литератури је показано да је доксорубицин супстрат ABCB1 транспортера, који је присутан у мембрани ендотелних ћелија КМБ и на туморским ћелијама које су развиле вишеструку резистенцију на лекове (4).

Напоследку, кандидаткиња је навела још један значајан фактор који доприноси резистенцији, рецидиву тумора и неуспеху терапије, а то је постојање матичних ћелија глиобластома (енгл. *glioblastoma stem cells*, GSCs). GSCs имају способност самообнављања, иницијације настанка тумора, избегавања ћелијске смрти и метастазирања, а могу и да остану у стању мировања током дугог временског периода. Експериментални модели и клиничке студије указују на то да GSCs преживљавају многе уобичајене терапијске протоколе, што недвосмислено указује на њихов клинички значај (5). Разликује се пронеуронални и мезенхимски тип GSCs. Пронеуронални тип GSCs одговоран је за формирање резистентне популације ћелија, а мезенхимски тип GSCs, поред повећања резистенције, одговоран је и за инвазију (6).

На основу изнетих података из литературе, кандидаткиња је предочила како услед развоја резистенције и недовољне ефикасности јединог хемиотерапеутика који се користи у терапији глиобластома постоји велика потреба за новим приступом у лечењу ове болести, како би се смањила висока стопа рецидива и морталитета.

## **Предмет докторске дисертације**

На основу изнетих полазних основа, дефинисан је предмет научног истраживања у оквиру предложене докторске дисертације - испитивање интеракције бета-глюкана различитог порекла (квасац и јечам) са антитуморским лековима (темозоломид и доксорубицин) на ћелијским линијама и примарним ћелијским културама глиобластома. Познато је да бета-глюкани, полисахариди ћелијског зида бактерија, алги, гљива и неких житарица, показују способност имуномодулације туморске микросредине. Поред тога, показано је да бета-глюкани могу бити носачи лекова. Описан је транспорт темозоломида и доксорубицина до мозга посредован бета-глюканима (7). Темозоломид и доксорубицин се могу конјуговати са бета-глюканима преко линкера који садржи дисулфидну везу. Тако припремљени коњугати у воденој средини спонтано формирају наночестице, у којима је темозоломид, односно доксорубицин, заробљен у унутрашњем хидрофобном језгру, а хидрофилни бета-глюкани се налазе на површини. Такође је показано да након оралне



примене, наночестице пролазе епителну баријеру у цревима преко М ћелија, а затим подлежу ендоцитози од стране резидентних макрофага. Макрофаги са наночестицама се потом циркулаторним системом транспортују до мозга и пролазе КМБ. Унутарћелијски глутатион (GSH), чија је концентрација у региону тумора повишена, раскида дисулфидну везу између линкера и хемиотерапеутика у наночестицама, што резултује ослобађањем конјугованог темозоломида или доксорубицина. На овај начин се повећава концентрација лека у региону тумора, а транспорт у наночестицама фагоцитованим од стране макрофага омогућава пролазак КМБ.

До сада није испитан ефекат комбинованог третмана бета-гљуканима и поменути хемиотерапеутицима. Такође није испитано да ли се ефекат комбинованог третмана разликује зависно од порекла бета-гљукана, као ни да ли бета-гљукани испољавају цитотоксични ефекат на ћелијским линијама или примарним ћелијским културама глиобластома. Стога је кандидаткиња предложила да се у изради ове докторске дисертације као модел-системи користе а) хумана ћелијска линија глиобластома А-172, б) резистентна ћелијска линија А-172 и в) примарне ћелијске културе глиобластома. Примарне ћелијске линије су успостављене из узорака тумора пацијената оболелих од глиобластома, који се лече на Клиници за неурохирургију Универзитетског Клиничког центра Србије, за шта је издата Етичка дозвола Медицинског факултета (183/13 од 27.4.2023. године).

Истраживање ће обухватити:

- 1) испитивање цитотоксичности комбинованих третмана бета-гљуканима из различитих извора са антитуморским лековима (темозоломид и доксорубицин) на ћелијама глиобластома;
- 2) испитивање утицаја комбинованих третмана на ћелијску смрт и аутофагију ћелија глиобластома;
- 3) испитивање утицаја комбинованих третмана на инвазивни капацитет ћелија глиобластома;
- 4) испитивање утицаја комбинованих третмана на целокупан експресиони профил ћелија глиобластома:
  - развој новог имуноесеја који ће омогућити испитивање утицаја комбинованих третмана на протеинску експресију маркера GSCs (CD133 и SOX2, као маркера пронеуралног типа GSCs, а CD44 и EGFR, као маркера мезенхимског типа GSCs);
  - испитивање утицаја комбинованих третмана на протеинску експресију маркера вишеструке резистенције (ABCB1, ABCC1 и ABCG2) ћелија глиобластома.

Као основну хипотезу својих истраживања, кандидаткиња је навела да комбинација бета-гљукана са антитуморским лековима има потенцијал да:

- побољша антитуморски ефекат темозоломида и доксорубицина на ћелијама глиобластома (односно, да оствари синергистички ефекат са наведеним хемиотерапеутицима);
- омогући превазилажење резистенције;
- утиче на ћелијске процесе као што су апоптоза, аутофагија и инвазија;
- утиче на матични фенотип ћелија глиобластома.

## Научни циљ истраживања

Научни циљ истраживања је испитивање механизма интеракције бета-гљукана из јечма и квасца са темозоломидом и доксорубицином на ћелијским линијама и примарним ћелијским културама глиобластома, као и испитивање ефеката ових комбинација на релевантне ћелијске и молекулске процесе. Посебна пажња ће бити посвећена утицају комбинованих третмана на експресију маркера вишеструке резистенције, с обзиром на њихов клинички значај. У циљу испитивања потенцијала бета-гљукана за реверзију резистенције биће успостављена резистентна ћелијска линија од сензитивне ћелијске линије хуманог глиобластома A-172 континуираном применом темозоломида.

Имајући у виду да темозоломид и доксорубицин, посредством ДНК, остварују ефекат на пролиферишућим ћелијама, али не и на ћелијама које се налазе у стању мировања, као што су поједини типови GSCs (5), кандидаткиња је предочила зашто је један од циљева истраживања развој новог имуноесеја који ће омогућити дистинкцију пронеуралног од мезенхимског типа GSCs, који имају значајну улогу у преживљавању и инвазији ћелија глиобластома и укључени су у развој резистенције на лекове. Сличан имуноесеј за идентификацију маркера резистенције код неситноћелијског тумора плућа је недавно развијен у Лабораторији за молекуларну неуро-онкологију, Одељење за Неуробиологију, на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду, у којој ће кандидаткиња обавити експериментални део своје докторске дисертације (8). Комбинација ова два имуноесеја омогућиће процену резистентног профила ћелија глиобластома третираних темозоломидом и доксорубицином и даће увид у то да ли комбиновани третман бета-гљуканима доприноси смањењу резистенције. На тај начин ће се утврдити потенцијал бета-гљукана за модулацију вишеструке резистенције, што ће служити као основа за нова истраживања на комбинацијама бета-гљукана са другим антитуморским лековима код различитих типова тумора.

Такође, испитаће се утицај комбинованих третмана на апоптозу, аутофагију и инвазивни капацитет ћелија глиобластома.

Према увиду Комисије, на основу полазних основа и хипотеза, циљ истраживања је реалан и остварив у периоду предвиђеном за реализацију докторске дисертације.

## Материјал и методе који се користе

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

Модел системи на којима ће се спроводити истраживања у току израде ове докторске дистертације су комерцијално доступна хумана ћелијска линија глиобластома A-172, као и примарне ћелијске културе глиобластома успостављене из туморских узорака пацијената оболелих од глиобластома. Додатно, биће успостављена резистентна ћелијска линија на поменуте хемиотерапеутике од сензитивне A-172 ћелијске линије глиобластома. Резистенција ће се развијати континуалним третманима сензитивне линије темозоломидом или другим алкилирајућим хемиотерапеутицима у периоду од неколико месеци. Резистентна ћелијска линија ће се користити у даљим експериментима у циљу испитивања могућности реверзије резистенције комбинованим третманом бета-глюканима и темозоломидом, односно доксорубицином. Ћелије ће бити култивисане у стандардним условима и у препорученим медијумима за њихов раст.

Испитивање ефекта појединачних терапеутика и комбинованих третмана на вијабилност ћелија извршиће се колориметријским тестом метаболичке активности (*MTT* тест), који се заснива на акумулацији тетразолијумових соли у митохондријама метаболички активних ћелија. Иницијални опсег концентрација биће од 1  $\mu$ M до 1 mM за темозоломид и од 10 nM до 10  $\mu$ M за доксорубицин, а време трајања третмана 72 h. Комбиновани ефекат бета-глюкана и антитуморских лекова биће анализиран у *CacluSyn* софтверу. На основу добијених резултата биће одабране најбоље комбинације, концентрације и време трајања третмана за наредне експерименте.

За детаљну анализу експресионог профила, како сензитивних, тако и резистентних ћелијских линија глиобластома, пре и после примене комбинованих терапија, користиће се секвенцирање целокупне РНК (*RNAseq*) у комбинацији са напредним биоинформатичким методама. Овај приступ омогућиће разумевање молекуларних промена које комбиновани третмани изазивају на нивоу транскриптома.

*Molecular Devices ImageXpress<sup>®</sup>Pico* и *Molecular Devices MetaXpress* софтвер, као и проточна цитофлуориметрија ће се, уз одговарајуће комплете, користити и за испитивање утицаја комбинованих третмана на апоптозу, аутофагију и промену мембранског потенцијала митохондрија. За испитивање утицаја комбинованих третмана на инвазивни капацитет ћелија користиће се тест инвазије кроз матригел, у којем се инвазивни потенцијал процењује на основу способности ћелија да уз концентрациони градијент серума прођу кроз поре мембране обложене матриксом базалне мембране.

За развој новог имуноесеја користиће се аутоматизовани флуоресцентни микроскоп *Molecular Devices ImageXpress<sup>®</sup>Pico* и *Molecular Devices MetaXpress* софтвер. Истовремено бојење GFAP-а, маркера глијалних ћелија, и бојење са *Hoechst 33342* који боји нуклеусе, обезбедиће идентификацију и квантификацију ћелија глиобластома након појединачних третмана темозоломидом и доксорубицином и након комбинованих третмана са бета-глюканима. Коришћењем овог аутоматизованог система за снимање ћелија, биће развијен нови имуноесеј за рутинску идентификацију. Овај имуноесеј ће омогућити идентификацију свих нуклеуса, GFAP-позитивних ћелија и ћелија позитивних на један од MDR маркера или на један од GSCs маркера. Истовремено бојење CD133, SOX2, CD44 или EGFR, уз бојење GFAP и *Hoechst 33342* ће омогућити идентификацију и квантификацију различитих типова стем ћелија глиобластома:

- GFAP-позитивне и CD133 или SOX2- позитивне, што одговара пронеуралном типу GSCs;

- GFAP- позитивне и CD44 или EGFR- позитивне, што одговара мезенхималном типу GSCs.

По истом принципу, истовремено бојење ABCB1, ABCC1 и ABCG2, уз бојење GFAP и са *Hoechst 33342* ће омогућити идентификацију и квантификацију:

- GFAP-позитивних и MDR маркер-негативних ћелија, што одговара сензитивним ћелијама глиобластома;
- GFAP-позитивних и MDR маркер-позитивних ћелија, што одговара резистентним ћелијама глиобластома.

На тај начин ће се утврдити да ли бета-глюкани утичу на резистентни и матични фенотип ћелија глиобластома када се примењују са темозоломидом и доксорубицином.

### Очекивани резултати и научни допринос

На основу података из литературе и на основу почетних хипотеза, кандидаткиња је навела да очекивани резултати подразумевају следеће:

- остварење синергистичког ефекта бета-глюкана и темозоломида, односно доксорубицина на ћелијама глиобластома;
- реверзију резистенције ћелија глиобластома на темозоломид и доксорубицин;
- разјашњење да ли извор бета-глюкана утиче на ефекат који остварују;
- детаљно разјашњење природе интеракције између бета-глюкана и темозоломида и доксорубицина на ћелијама глиобластома, односно молекулских механизма који леже у њеној основи;
- смањење способности ћелија глиобластома да одрже фенотип матичних ћелија након комбиноване терапије бета-глюкана и темозоломида, односно доксорубицина.

База података *ClinicalTrials.gov* резимира око 180 клиничких испитивања са бета-глюканима као имуномодулаторима, углавном код малигнух обољења, терапије гастроинтестиналног тракта, снижења холестерола и побољшања имунолошких реакција. Када су у питању истраживања везана за терапију тумора, она која највише обећавају укључују употребу бета-глюкана у комбинацији са моноклонским антителима код неситноћелијског канцера плућа, колоректалног карцинома и троструко негативног карцинома дојке. Међутим, клиничке студије са бета-глюканима на глиобластомима никада нису спроведене. Иако је откривен пут транспорта темозоломида и доксорубицина у мозак коришћењем посредован бета-глюканима (7), још увек није испитано да ли бета-глюкани могу да интерагују са темозоломидом и доксорубицином и побољшају анти-туморске ефекте ових лекова. Оно што ова докторска дисертација доноси је разјашњење, по први пут, комбинованог ефекта бета-глюкана са темозоломидом и доксорубицином на ћелијама глиобластома. С обзиром на то да транспорт темозоломида и доксорубицина до мозга посредован бета-глюканима може направити значајан напредак у терапији пацијената са глиобластомима, од велике је важности да се разјасни могуће побољшање анти-туморског ефекта темозоломида и доксорубицина у комбинацији са бета-глюканима, као и утицај ових комбинација на резистенцију на темозоломид и доксорубицин. Уз то,

претпоставка је да ће се ефекат бета-гљукана у комбинацији са темозоломидом и доксорубицином разликовати у зависности од извора из којег су иловани, односно да ће неки бета-гљукани бити бољи појачивачи антитуморског дејства ових хемиотерапутика.

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

1. Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 352(10), 987–996.
2. Ortiz, R., Perazzoli, G., Cabeza, L., Jiménez-Luna, C., Luque, R., Prados, J., & Melguizo, C. (2021). Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. *Current neuropharmacology*, 19(4), 513–537.
3. Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., & Gottesman, M. M. (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature reviews. Cancer*, 18(7), 452–464.
4. Liao, W. H., Hsiao, M. Y., Kung, Y., Huang, A. P., & Chen, W. S. (2021). Investigation of the Therapeutic Effect of Doxorubicin Combined With Focused Shockwave on Glioblastoma. *Frontiers in oncology*, 11, 711088.
5. Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell stem cell*, 14(3), 275–291.
6. Wang, Z., Zhang, H., Xu, S., Liu, Z., & Cheng, Q. (2021). The adaptive transition of glioblastoma stem cells and its implications on treatments. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 124.
7. Miao, Y. B., Chen, K. H., Chen, C. T., Mi, F. L., Lin, Y. J., Chang, Y., Chiang, C. S., Wang, J. T., Lin, K. J., & Sung, H. W. (2021). A Noninvasive Gut-to-Brain Oral Drug Delivery System for Treating Brain Tumors. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 33(34), e2100701.
8. Dinić J, Podolski-Renić A, Dragoj M, Jovanović Stojanov S, Stepanović A, Lupšić E, Pajović 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 Dec 7;13(24):3617. doi: 10.3390/diagnostics13243617.

### **Г. Закључак и предлог:**

На основу увида у предложено истраживање, Комисија утврђује да је предложена тема научно заснована и да би очекивани резултати допринели проналажењу ефикаснијег приступа у лечењу 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. Стога долепотписана Комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Биолошког факултета да кандидаткињи **Милицы Пајовић**, мастер биологу, одобри израду докторске дисертације под насловом „**Потенцијал бета-глюкана за смањење и реверзију резистенције ћелија глиобластома**”.

Комисија за менторе предлаже др Миодрага Драгоја, научног сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду и проф. др Надежду Недељковић, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Београд, 31.05.2024.

Комисија:

---

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

---

проф. др Надежда Недељковић, редовни професор,  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

---

др Миодраг Драгој, научни сарадник,  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ –  
Институт од националног значаја за Републику Србију,  
Универзитет у Београду



## КЛИНИЧКИ ЦЕНТАР СРБИЈЕ

11000 БЕОГРАД; ПАСТЕРОВА 2,  
РЕПУБЛИКА СРБИЈА

### ЕТИЧКИ ОДБОР

11000 Београд, Пастерова 2  
011 366-2080, 264-4850, Факс 011 306-7180

Број: 187/13

Дана: 27.04.2023. године

На основу Закона о здравственој заштити Републике Србије („Сл. гласник РС“ бр. 25/2019), Закона о правима пацијената („Сл. гласник РС“, бр. 45/13), Закона о заштити података о личности („Сл. гласник РС“, бр. 97/2008, 104/2009, идр. Закон), Закона о здравственој документацији и евиденцијама у области здравства („Сл. гласник РС“, бр. „, бр. 123/2014, 106/2015, 105/2017), поступајући у складу са одредбама Етичког одбора Универзитетског клиничког центра Србије бр. 175/9 од 29.04.2021. године, Етички одбор Универзитетског клиничког центра Србије у саставу: Проф. др Милан Радовић-председник, Проф. др Ана Видовић, Проф. др Светлана Врзић-Петронијевић, Доц. др Слађана Андрејевић, Проф. др Никица Грубор, Доц. др Данијела Трифуновић-Замаклар и Асист. др Михајло Стјепановић – лекари специјалисти запослени у Универзитетском клиничком центру Србије, одлучујући о захтеву Асист. др Игора Николића, на својој 3. седници одржаној дана 27.04.2023. године, донео је следећу

### ОДЛУКУ

Одобрава се спровође клиничког испитивања под називом: “Нове терапеутске стратегије за персонализовану терапију, астроцитом примерних и секундарних глиобластома”. Главни истраживач је Асист. др Игор Николић.

Чланови истраживачког тима су: Асист. др Игор Николић и Др Горан Тасић.

Истраживачи сарадници су: Др Милица Пешић, Др Ана Подолски-Ренић, Др Јелена Динић, Др Миодраг Драгој, Др Софија Јовановић-Стојанов и студенти докторанти: Ана Степановић, Ема Лупшић и Милица Пајовић.

Испитивање ће бити спроведено на Клиници за неурохирургију Универзитетског клиничког центра Србије, у сарадњи са Институтом за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду.

Приликом доношења ове одлуке, Етички одбор је разматрао следећу документацију:

- 1). Захтев за одобрење академског клиничког испитивања поднет Етичком одбору УКЦС,
- 2). Протокол испитивања,
- 3). Информације за пацијента са обрасцем за давање писаног пристанка,
- 4). Сагласност колегијума Клинике за неурохирургију бр. 506 од 13.04.2023. године,
- 5). Споразум о пословно-техничкој сарадњи бр. 29173 од 18.11.2011. године закључен између Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ и Универзитетског клиничког центра Србије и
- 6). Биографија главног истраживача, члана истраживачког тима и биографије истраживача сарадника.

ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ ОДБОРА

Проф. др Милан Радовић