

Биолошки факултет
Број захтева: 50/228-1
Датум: 7. 11. 2024.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуке о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације и о именовану комисије за одбрану

Молимо да, сходно члану 48. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 201/2018, 207/2019, 213/2020, 214/2020, 217/2020, 230/21, 232/22 и 236/22), дате сагласност на одлуку о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације:

КАНДИДАТ: **Ана Р. Деспотовић**

студент докторских студија на студијском програму: Биологија, модул: Анимална и хумана физиологија, уписан на докторске студије 2017/2018 године,

пријавио је тему докторске дисертације дана 15. 6. 2021. под називом:

„Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома”

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биолошке науке.

Универзитет је дана 23. 9. 2021. године. својим актом под бр. 02-07 Број: 61206-3554/2-21 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома“

Име и презиме ментора: др Гордана Товиловић Ковачевић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", Институт од националног значаја за Републику Србију и др Ива Лакић, доцент, Универзитет у Београд - Биолошки факултет.

Комисија за оцену докторске дисертације образована је на седници одржаној 10. 9. 2024. год, одлуком Факултета под бр. 50/187 у саставу:

Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1. др Невена Зоговић	научни саветник	ћелијска неуробиологија	Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију
2. др Кристина Јањетовић	виши научни сарадник	ћелијска биологија	Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ –Институт од националног значаја за Републику Србију
3. др Тања Јевђовић	ванредни професор	физиологија животиња и човека	Универзитет у Београду – Биолошки факултет

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Датум стављања извештаја Комисије и докторске дисертације на увид јавности 1. 10. 2024. године.

Наставно-научно веће факултета усвојило је извештај Комисије за оцену докторске дисертације на седници одржаној 7. 11. 2024. године.

Комисија за одбрану докторске дисертације именована је на седници одржаној 7. 11. 2024. године, одлуком факултета под бр. 50/227, у саставу:

Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1. др Невена Зоговић	научни саветник	ћелијска неуробиологија	Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију
2. др Кристина Јањетовић	виши научни сарадник	ћелијска биологија	Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ –Институт од националног значаја за Републику Србију
3. др Тања Јевђовић	ванредни професор	физиологија животиња и човека	Универзитет у Београду – Биолошки факултет

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

- Прилог: 1. Одлука Наставно-научног већа о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације и одлука о именовању Комисије за одбрану докторске дисертације**
2. Извештај Комисије о оцени докторске дисертације
3. Примедбе на извештај Комисије о оцени докторске дисертације (уколико их је било) и мишљење Комисије о примедбама



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

50/228 - 7. 11. 2024.

На основу члана 40. став 3. Закона о високом образовању и члана 38. став 1. Правилника о докторским академским студијама Универзитету у Београду - Биолошком факултету, Наставно-научно веће Факултета, на II редовној седници одржаној 7. 11. 2024. године, донело је

ОДЛУКУ

1. Усваја се Извештај Комисије за оцену докторске дисертације кандидата:

Ане Р. Деспотовић, под називом:

„Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома“

2. Именује се Комисија за одбрану докторске дисертације из тачке 1. Ове одлуке:

- др Невена Зоговић, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију – члан,

- др Кристина Јањетовић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију – члан,

- др Тања Јевђовић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет – члан.

Универзитет је дана 23. 9. 2021. године. својим актом под бр. 02-07 Број: 61206-3554/2-21 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

Образложење

Наставно-научно веће Факултета, на седници оджаној 7. 11. 2024. године, размотрило је Извештај Комисије за оцену докторске дисертације и констатовало да је докторска дисертација у складу са одобреном темом и да кандидат испуњава све услове за одбрану докторске дисертације предвиђене Правилником о докторским академским студијама на Универзитету у Београду - Биолошком факултету, укључујући и

Радове и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. **Despotović, A., Mirčić, A., Misirlić-Denčić, S., Harhaji-Trajković, L., Trajković, V., M21 Zogović, N., & Tovilović-Kovačević, G. (2022). Combination of Ascorbic Acid and Menadione Induces Cytotoxic Autophagy in Human Glioblastoma Cells. Oxidative medicine and cellular longevity, 2022, 2998132. <https://doi.org/10.1155/2022/2998132>, M21**
Линк ка публикацији на интернету:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8967583/>
2. **Despotović, A., Janjetović, K., Zogović, N., & Tovilović-Kovačević, G. (2023). M21 Pharmacological Akt and JNK Kinase Inhibitors 10-DEBC and SP600125 Potentiate Anti-Glioblastoma Effect of Menadione and Ascorbic Acid Combination in Human U251 Glioblastoma Cells. Biomedicines, 11(10), 2652. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102652>, M21**
Линк ка публикацији на интернету:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10604608/>

Будући да наводи садржани у Извештају Комисије потврђују да су се стекли услови за одбрану докторске дисертације, то је донета одлука као у диспозитиву.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.
- Архиви Факултета

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ -

БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На X редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној **10. септембра 2024. године**, на основу молбе ментора, др Гордане Товиловић Ковачевић, вишег научног сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду и др Иве Лакић, доцента Биолошког факултета, Универзитета у Београду – одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације кандидата **Ане Р. Деспотовић**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, под насловом: **„Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома“**, у саставу:

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

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

др Тања Јевђовић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Ане Р. Деспотовић** под насловом **„Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома“** написана је на 123 стране. Нумерисани део докторске дисертације (основни текст) садржи следеће целине: **Увод** (22 стране), **Циљеви** (1 страна), **Материјал и методе** (15 страна), **Резултати** (32 стране), **Дискусија** (16 страна), **Закључци** (1 страна), **Литература** (19 страна). Дисертација садржи 4 схеме и 1 табелу у оквиру поглавља Увод; 3 табеле у оквиру поглавља Материјал и методе; 34 слике (које представљају приказ оригиналних резултата истраживања кандидата) у склопу поглавља Резултати, 6 схема у поглављу Дискусија и 270 референци у оквиру поглавља Литература. Дисертација садржи и нумерисани део који обухвата: насловне странице на српском и енглеском језику (2 стране), страницу са подацима о менторима, члановима комисије и датумом одбране дисертације (1 страна), страницу са подацима о институцијама у којима је спроведен експериментални рад (1 страна), захвалницу (1 страна), сажетке на српском и енглеском језику са кључним речима (2 стране), регистар скраћеница (4 стране), регистар табела, схема и слика (2 стране) и садржај (5 страна). У оквиру прилога се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Предмет докторске дисертације Ане Р. Деспотовић је био проучавање потенцијалног антиглиобластомског ефекта комбинације аскорбинске киселине (АК) и менадиона (МД) на ћелијском моделу хуманог глиобластома – ћелијској линији U251. У докторској дисертацији је спитиван утицај појединачних и комбинованог третмана на процес аутофагије у U251 ћелијама, као и могућност појачавања њиховог цитотоксичног ефекта применом инхибитора киназа укључених у најчешће измењене сигналне путеве одговорне за резистенцију глиобластома на терапију – инхибитора АКТ киназе (10-DEBC хидрохлорид, у даљем тексту 10-DEBC) и инхибитора JNK (енгл. *c-Jun N-terminal kinase*) киназе (SP600125). У првом делу студије је детаљно истражен ефекат АК и МД, примењених појединачно и у комбинацији (АК+МД), на унутарћелијску производњу реактивних врста кисеоника (РВК) и процес аутофагије и одређен је тип ћелијске смрти коју изазивају цитотоксични третмани (АК+МД). Други део студије је обухватао одређивање улоге АКТ и митогеном активираних протеинских киназа (енгл. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) у цитотоксичности АК+МД и детаљно испитивање утицаја инхибиције АКТ и JNK на унутарћелијске механизме који се покрећу у одговору на третмане АК, МД и АК+МД. Такође, испитан је утицај свих третмана тестираних у оквиру ове студије на малигно-неизмењену ћелијску линију – плућне фибробласте MRC5.

Поглавље **Увод** се састоји од седам главних потпоглавља. У првом потпоглављу су описане опште карактеристике малигнух болести, преглед основних обележја малигнух тумора и статистички подаци о малигнитетима у Републици Србији, са освртом на туморе централног нервног система (ЦНС). Друго потпоглавље представља тренутно важећу класификацију глиома према критеријумима Светске здравствене организације, као и податке о епидемиологији и стандардним протоколима за терапију глиобластома. Такође, објашњени су и разлози неуспеха доступне терапије. У трећем потпоглављу су описани сигнални путеви PI3K (фосфатидил инозитол 3-киназа)/АКТ и MAPK/JNK, који су најчешће измењени у ћелијама глиобластома, а повезани су са малигнуом трансформацијом, хистолошким градусом, инвазивним растом и резистенцијом овог тумора на терапију. Посебно је издвојено потпоглавље у ком је дат преглед најважнијих инхибитора АКТ и JNK киназа чији се антитуморски потенцијал тренутно истражује у преклиничким и клиничким студијама. Четврто потпоглавље Увода даје упоредни преглед редокс статуса у здравим и малигно-трансформисаним ћелијама, са посебним освртом на улогу митохондрија у стварању РВК као и у метаболичком репрограмирању ћелија глиобластома. У овом одељку је описана и улога агенаса који изазивају оксидативни стрес и нарушавају интегритет и функцију митохондрија као потенцијалних лекова у борби против малигнух болести, односно глиобластома. Менадион и аскорбинска киселина, познати редокс-активни пар, описани су у петом потпоглављу. Најпре су наведене опште структурне и биохемијске карактеристике менадиона и других хинона који припадају класи витамина К, а затим су детаљно описане антитуморске карактеристике менадиона које се доминантно заснивају на његовом прооксидативном дејству. Објашњен је унутарћелијски метаболизам менадиона, који се одиграва у редокс циклусима при чему се стварају слободни радикали који оштећују ћелијске структуре. Описани су механизми којима менадион нарушава хомеостазу митохондрија у малигнуим ћелијама и истакнуто је да то може бити један од разлога селективног цитотоксичног дејства менадиона на малигне у односу на здраве ћелије. Коначно, наведен је преглед литературних података о антиглиобластомским ефектима менадиона показаним у *in vitro* и *in vivo* моделима овог тумора. У другом делу потпоглавља описане су хемијске карактеристике и физиолошка улога аскорбинске киселине, као и оксидо-редукционе особине које зависе

од њене концентрације. Наведени су антитуморски ефекти аскорбинске киселине, уз преглед студија које су се детаљније бавиле ефектима аскорбинске киселине на малигне ћелије. На крају петог потпоглавља описан је неензимски редокс циклус менадиона у присуству аскорбата који се одиграва током интеракције ова два једињења, а који резултира оксидативним стресом у малигним ћелијама. Јасно су описане основе селективности ове комбинације према малигним у односу на здраве, малигно-неизмењене ћелије. Даље су детаљно приказана оштећења, процеси и типови ћелијске смрти које комбинација АК+МД изазива у туморским ћелијама и дат је преглед студија о токсичним ефектима АК+МД у различитим *in vitro* и *in vivo* моделима тумора. У шестом потпоглављу је дат увид у типове ћелијске смрти, објашњене су разлике између задесне и регулисане ћелијске смрти и детаљније су описане промене које се дешавају током апоптозе и некрозе, као типа I и типа III ћелијске смрти. Аутофагија (тип II) ћелијске смрти описана је у последњем, седмом потпоглављу Увода. Представљена су три морфолошки различита типа аутофагије (микроаутофагија, аутофагија посредована шаперонима и макроаутоагија). Детаљно су описане морфолошке фазе и молекуларни механизми регулације аутофагије, са јасно наведеним протеинима и главним протеинским комплексима који су неопходни за одвијање овог процеса. Посебно су истакнути регулаторни протеини, протеински производи аутофагних гена и најзначајнији маркери аутофагног процеса, који су експериментално праћени у овој студији. Сложена регулација процеса аутофагије на транскрипционом и посттранскрипционом нивоу описана је у оквиру посебног потпоглавља. Такође је описана и објашњена и двосмерна веза између оксидативног стреса и процеса аутофагије: механизми путем којих РВК позитивно регулишу аутофагни одговор у ћелијама и улога аутофагије у антиоксидативној заштити ћелије. Објашњење сложене улоге аутофагије у ћелијском одговору на токсичне стимулусе, као и у малигној трансформацији ћелија и избегавању токсичних ефеката хемиотерапије, такође је дато у оквиру посебног дела у седмом потпоглављу. На крају је дат преглед података из литературе који се односе на улогу аутофагије у одговору ћелија глиобластома на примену стандардног хемиотерапеутика темозоломида и радиотерапије, као главних компоненти конвенционалног протокола лечења.

У поглављу **Циљеви** представљено је пет циљева ове докторске дисертације:

- Испитати цитотоксичност комбинације АК и МД у култури ћелија хуманог глиобластома U251.
- Испитати тип ћелијске смрти и молекуларне механизме цитотоксичног дејства комбинације АК+МД у култури U251 ћелија.
- Испитати улогу аутофагије у одговору U251 ћелија на цитотоксичну активност комбинације АК+МД.
- Испитати утицај инхибитора АКТ киназе – 10-DEBC и инхибитора JNK киназе – SP600125 на цитотоксичност МД и АК+МД и молекуларне механизме посредством којих 10-DEBC и SP600125 утичу на исход третмана МД и АК+МД у култури U251 ћелија.
- Испитати утицај појединачних и комбинованих третмана МД, АК+МД, 10-DEBC и SP600125 на вијабилност хуманих фибробласта MRC5, као модела малигно неизмењених ћелија.

Поглавље **Материјал и методе** садржи 11 потпоглавља у којима су детаљно описане експерименталне методе и услови који су примењивани током извођења експеримената. Свако потпоглавље је написано детаљно и систематично, са прегледом коришћених реагенаса, описом теоријске основе методе и подробним описом примењене процедуре који омогућава поновљивост спроведених

експеримената. На почетку поглавља су наведени уређаји који су коришћени у експериментима, као и софтвери за обраду добијених резултата. Наведени су и ћелијски модели (ћелијске линије U251 и MRC5) и услови у којима су одржаване културе ћелија, састави медијума за култивацију и детаљи о *in vitro* култивацији ћелијских култура. Најпре су, у оквиру посебних целина, описани тестови коришћени за одређивање вијабилности ћелија – кристал виолет и МТТ тест. Затим је објашњена анализа типа интеракције коју остварују агенси примењени у комбинацији (АК+МД), односно рачунање комбинаторног индекса чија вредност одређује врсту интеракције. У петом и шестом потпоглављу описане су методе микроскопирања: светлосна и трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ), помоћу којих су анализиране морфолошке и ултраструктурне карактеристике ћелија, са детаљним описом припреме препарата за ТЕМ. Даље су кроз 5 одвојених целина описане различите анализе ћелија проточном цитофлуориметријом примењене у овој дисертацији: анализа типа ћелијске смрти, мерење активности каспаза, унутарћелијске производње РВК и потенцијала мембране митохондрија, као и детекција киселих унутарћелијских везикула. У потпоглављу о имуноблот анализи су, кроз шест целина, описани сви кораци имуноблота (изолација протеина, одређивање њихове концентрације, припрема узорака за електрофорезу и електрофореза, трансфер протеина са гела на мембрану и детекција протеина од интереса). Наведена су сва коришћена антитела и њихова разблажења, као и састав употребљених раствора који је прегледно написан у форми табеле. Осмо потпоглавље даје детаљан приказ анализе транскрипције гена. Подељено је у неколико целина са описом процедуре изолације и одређивања концентрације РНК, реверзне транскрипције изоловане РНК у комплементарну ДНК и ланчане реакције полимеразе и детекције производа у реалном времену. Табеларно су представљени услови и састав реакционих смеша, укључујући специфичне прајмере и пробе коришћене у реакцији ланчаног умножавања. У десетом потпоглављу су приказани детаљи о методама манипулације генском експресијом: утишавање гена помоћу малих интерферирајућих РНК (енгл. *small interfering RNA*, siRNA) и прекомерно експримирање гена од интереса унетог у ћелије преко плазмидног вектора. Последње, једанаесто потпоглавље, садржи информације о статистичким методама коришћеним за обраду добијених резултата.

У поглављу **Резултати** јасно су приказани добијени експериментални подаци који су представљени у виду оригиналних графикана, слика и дијаграма са пратећим текстом. Поголавље је уобличено у 30 потпоглавља, наведених логичким редоследом, а пратећи текст систематично описује добијене резултате и изведене закључке. Најпре је показано да АК и МД појединачно не остварују цитотоксично дејство на U251 ћелије хуманог глиобластома, док у комбинацији (АК+МД) испољавају временски- и дозно-зависно цитотоксично дејство. Израчунавањем комбинаторног индекса утврђено је да АК и МД у комбинацији остварују интеракцију синергистичког типа. На приказаним микрографијама U251 ћелија изложених дејству АК+МД уочено је да комбинација изазива морфолошке и ултраструктурне промене које одговарају некрози. У наредним корацима је детаљније дефинисан тип ћелијске смрти коју овај третман изазива, а праћене су унутарћелијске промене које претходе ћелијској смрти. Документовано је да АК+МД изазива некрозу U251 ћелија без утицаја на активност каспаза и апоптозу. Такође је показано да АК+МД појачава производњу РВК у цитосолу и у матриксу митохондрија и да изазива деполаризацију митохондријске мембране, као и да је оксидативни стрес који настаје у ћелијама узрок ћелијске смрти. У наредних десет потпоглавља приказан је утицај испитиваних третмана на процес аутофагије. На микрографијама ћелија третираних МД и АК+МД уочене су везикуле налик аутофагозомима или аутолизозомима, а показано је и да долази до унутарћелијског накупљања везикула испуњених киселим садржајем. Анализом протеинских маркера

аутофагије утврђено је да испитивани третмани повећавају ниво LC3-II (енгл. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*, LC3), беклина-1, као и деградацију аутофагног супстрата – протеина p62. Додатном анализом аутофагног флукса потврђено да је повећање LC3-II форме протеина последица активације процеса аутофагије, а не блокаде разградње овог протеина у аутолизозомима. Праћењем транскрипције аутофагних гена је показано да АК+МД појачава експресију већине анализираних гена. Испитивањем активности киназа које регулишу процес аутофагије је утврђено да МД и АК+МД појачавају фосфорилацију АМПК (енгл. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*), позитивног регулатора аутофагије, али само АК+МД утиче на њене нисходне супstrate, односно активира ULK1 (енгл. *UNC-51-like kinase 1*) и инхибира mTOR (енгл. *mechanistic target of rapamycin*)/S6K. Применом антиоксиданса N-ацетил цистеина (NAC) показано је да су промене у нивоу протеинских маркера аутофагије (LC3-II и p62) као и у активности сигналног пута АМПК/mTOR/ULK1 биле изазване оксидативним стресом који се јавља услед третмана U251 ћелија комбинацијом АК и МД. Наредним резултатима је показано да аутофагија која се активира у U251 ћелијама доприноси елиминацији РВК из цитосола и митохондрија, али да се њеном генетичком и фармаколошком инхибицијом смањује цитотоксични ефекат АК+МД, док се вијабилност ћелија третираних МД у условима инхибиране аутофагије не мења. Даље је показано да аутофагија изазвана комбинацијом АК+МД доприноси некрози U251 ћелија и да фармаколошки и генетички активатори аутофагије иницирају/појачавају цитотоксично дејство МД/АК+МД, чиме је потврђено да аутофагија коју изазива АК+МД има цитотоксичну улогу у U251 ћелијама. У следећој групи експеримената праћен је утицај МД и АК+МД на активност АКТ и MAPK киназа. Показано је да комбинација АК+МД, након пролазне активације, изазива снажну инхибицију АКТ киназе и активира MAPK – JNK, ERK (енгл. *extracellular signal-regulated protein kinases*) и p38. Анализом улоге ових киназа у одговору U251 ћелија на примењене третмане показано је да инхибитор АКТ (10-DEBC) и инхибитор JNK (SP600125) појачавају ћелијску смрт у третманима МД и АК+МД, за разлику од инхибитора ERK (PD098059), који није утицао на ефекте МД и комбинације, и инхибитора p38 киназе (SB203580), који је спасио ћелије од цитотоксичног дејства АК+МД. Цитотоксичност МД и АК+МД је појачана и применом још једног инхибитора АКТ – перифозина, као и генетичком инхибицијом JNK киназе. У даљем току експеримената су детаљније изучавани механизми којима мали молекулски инхибитори 10-DEBC и SP600125 повећавају осетљивост U251 ћелија на МД и АК+МД, са посебним освртом на процес аутофагије и оксидативни стрес. Утврђено је да је појачавање цитотоксичног ефекта МД и АК+МД помоћу 10-DEBC и SP600125 последица појачавања некрозе U251 ћелија, без утицаја на активацију каспаза. Активација АКТ и JNK под дејством МД и комбинације је спречена у присуству NAC, а инхибиција ових киназа применом 10-DEBC и SP600125 довела је до значајног повећања количине РВК у U251 ћелијама изложеним дејству МД и АК+МД. У наредна три потпоглавља је показано да је повећање осетљивости U251 ћелија на МД и потенцирање цитотоксичности АК+МД под дејством 10-DEBC последица појачавања цитотоксичне аутофагије, док SP600125 своје дејство остварује независно од овог процеса. Следећу целину у резултатима чини детаљније испитивање улоге АКТ киназе у смрти U251 ћелија под дејством АК+МД. Показано је да познати активатор PI3K/АКТ сигналног пута – инсулин, као и прекомерна експресија конститутивно активне форме АКТ постигнута убацивањем плазмидног вектора са геном за миристиловани АКТ (myg-АКТ) у U251 ћелије смањују осетљивост U251 ћелија на АК+МД. Даље, применом myg-АКТ спречена је некроза U251 ћелија коју изазива третман АК+МД, смањена је количина РВК у ћелијама изложеним дејству МД и АК+МД и поништен је ефекат ових третмана на промену нивоа протеинских маркера аутофагије (LC3-II и p62). Коначно, показана је

селективност испитиваних једињења према малигним ћелијама, јер ниједан од третмана примењених у овој докторској дисертацији није смањивао вијабилност малигно-неизмењених хуманих фибробласта MRC5.

Поглавље **Дискусија** написано је као једна целина. У овом поглављу кандидат Ана Деспотовић тумачи добијене резултате систематично, са освртом на досадашња научна сазнања која су повезана са предметом истраживања и резултатима ове докторске дисертације. Поглавље Дискусија садржи и шест оригиналних схематских приказа који јасно показују везу између третмана и процеса који су били предмет изучавања ове докторске дисертације. Најпре је дискутован антиглиобластомски потенцијал комбинације АК и МД показан у овој докторској дисертацији, који је у складу са подацима из научне литературе, а посебно су истакнути механизми селективности овог редокс активног пара према малигним у односу на малигно-нетрансформисане ћелије. Дискутовано је синергистичко дејство АК и МД као и утицај ове комбинације на мембрански потенцијал митохондрија у U251 ћелијама глиобластома. С обзиром на важну улогу митохондрија у одржавању енергетског баланса, контроли ћелијске смрти и развоју резистентних типова глиобластома, посебно је дискутован значај нарушавања интегритета ових органела под дејством комбинације АК+МД. Даље је коментарисана улога оксидативног стреса у одговору глиобластомских ћелија на третман АК+МД. Посебан осврт је дат на податке из литературе који се односе на повезаност оксидативног стреса и ћелијске смрти изазване комбинацијом АК+МД на ћелијским линијама других малигнитета. Такође је објашњен утицај оксидативног стреса на процес аутофагије, дат је преглед студија које су испитивале утицај МД и АК+МД на аутофагију у другим ћелијским линијама и образложене су разлике између резултата ове и других студија из литературе. Дискутована је активација сигналних путева укључених у процес аутофагије и добијени резултати су сумирани на оригиналној схеми, на којој је јасно приказан утицај АК+МД на регулацију аутофагије у U251 ћелијама глиобластома. Посебна пажња је посвећена улози аутофагије у ћелијској смрти и разјашњавању различитог исхода аутофагног процеса у ћелијама које су изложене дејству МД у односу на ћелије третиране АК+МД. Други део поглавља Дискусија је посвећен тумачењу резултата који се односе на повећавање осетљивости U251 ћелија на МД и АК+МД применом малих молекулских инхибитора АКТ и JNK киназа, 10-DEBC и SP600125, редом. Резултати су коментарисани у светлу постојећих литературних података о ефектима различитих инхибитора ових киназа испитиваних на моделима глиобластома. Тумачен је допринос испитиваних инхибитора процесима које у U251 ћелијама покреће АК+МД, а то су појачано накупљање РВК, аутофагија и, коначно, некроза. У складу са добијеним резултатима, претпостављен је механизам којим испитивани инхибитори повећавају осетљивост U251 ћелија на МД и потенцирају токсичност комбинације АК+МД у ћелијама глиобластома. Такође, дискутована је улога АКТ и JNK киназа у одговору U251 ћелија на МД и АК+МД, са критичким освртом на релевантне литературне податке у вези са активношћу ових киназа у одговору различитих типова малигних ћелија на прооксидативне агенсе. Даље, узевши све добијене резултате у обзир, кандидат истиче запажање да појединачни третмани не испољавају цитотоксичан ефекат на U251 ћелије, већ да њихове комбинације, и то само оне у којима је присутан МД, изазивају смрт ћелија глиобластома. С обзиром на суштински значај селективности антитуморских агенаса према малигним ћелијама, посебна пажња је посвећена тумачењу резултата који показују да испитивани третмани, ни појединачно ни у комбинацијама нису токсични за малигно неизмењене ћелије хуманих фибробласта плућа. На крају, ефекти појединачних и комбинованих третмана проучавани у овој докторској дисертацији и њихове сличности и разлике сумирани су у виду Веновог дијаграма представљеног на Схеми 10.

У поглављу **Закључци**, Ана Деспотовић је сумирала добијене резултате извођењем пет закључака који у потпуности одговарају циљевима постављеним на почетку израде докторске дисертације:

- Појединачни третмани АК и МД немају цитотоксично дејство, док у комбинацији АК и МД синергистички убијају ћелије хуманог глиобластома U251 *in vitro*.
- Комбинација АК+МД изазива оштећење ћелијске мембране, повећање унутарћелијских РВК и деполаризацију мембране митохондрија, што резултира некрозом U251 ћелија зависном од оксидативног стреса.
- Комбинација АК+МД појачава транскрипцију аутофагних гена, изазива појаву маркера аутофагије и АМПК/mTOR/ULK1 зависну аутофагију у U251 ћелијама. Изазвана аутофагија је последица оксидативног стреса и има цитотоксичну улогу, односно доприноси некрози U251 ћелија.
- Мали молекулски инхибитори АКТ киназе – 10-DEBC и JNK киназе – SP600125 повећавају осетљивост U251 ћелија на примењене третмане и подстичу некрозу у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД. 10-DEBC појачава оксидативни стрес и потенцира цитотоксичну аутофагију у ћелијама глиобластома третираним МД и АК+МД. SP600125 потенцира токсичност МД и АК+МД појачавањем оксидативног стреса, независно од процеса аутофагије.
- Ниједан од испитиваних третмана не утиче на вијабилност малигно неизмењене ћелијске линије хуманих фибробласта MRC5.

Поглавље **Литература** садржи 270 библиографских јединица. Литературни извори су релевантни, актуелни и адекватно цитирани.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Despotović, A.,** Mirčić, A., Misirlić-Denčić, S., Harhaji-Trajković, L., Trajković, V., Zogović, N., & Tovilović-Kovačević, G. (2022). Combination of Ascorbic Acid and Menadione Induces Cytotoxic Autophagy in Human Glioblastoma Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022, 2998132.
<https://doi.org/10.1155/2022/2998132>, **M21**

Линк ка публикацији на интернету:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8967583/>

2. **Despotović, A.,** Janjetović, K., Zogović, N., & Tovilović-Kovačević, G. (2023). Pharmacological Akt and JNK Kinase Inhibitors 10-DEBC and SP600125 Potentiate Anti-Glioblastoma Effect of Menadione and Ascorbic Acid Combination in Human U251 Glioblastoma Cells. *Biomedicines*, 11(10), 2652.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11102652>, **M21**

Линк ка публикацији на интернету:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10604608/>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Despotović, A.,** Tovilović-Kovačević, G., Zogović, N., Harhaji-Trajković, L., & Trajković, V. (2018). Combination of menadione and ascorbate induces oxidative stress and mTOR-dependent cytotoxic autophagy. in Final program and abstract book: 8th International Congress of Pathophysiology, Satellite Symposium: Oxidative Stress in

Health and Disease: from Basic Science to Applied Investigations; 2018 Sep 03; Kragujevac, Serbia. Kragujevac: University of Kragujevac, Faculty of Medical Science., 34-34. https://hdl.handle.net/21.15107/rcub_ibiss_6365, M34

2. **Despotović, A.**, Harhaji-Trajković, L., Trajković, V., Tovilović-Kovačević, G., & Zogović, N. (2021). Necrostatin-1 enhances menadione/ascorbic acid-induced oxidative stress and their cytotoxic potential in human glioblastoma U251 cell line. in Free Radical Research Europe (SFRR-E) Annual Meeting Abstracts "Redox biology in the 21st century: a new scientific discipline" 15-18 June 2021, Belgrade, Serbia. Elsevier Inc., 78. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.081>, M34
3. **Despotović, A.**, Zogović, N., Trajković, V., Harhaji-Trajković, L., & Tovilović-Kovačević, G. (2021). Antiglioma effect of ascorbic acid and menadione combination in U251 glioblastoma cell line is mediated by ROS-dependent downregulation of Akt. in Free Radical Research Europe (SFRR-E) Annual Meeting Abstracts "Redox biology in the 21st century: a new scientific discipline" 15-18 June 2021, Belgrade, Serbia. Elsevier Inc., 69. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.072>, M34

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата **Ане Р. Деспотовић** (број индекса **Б3024/2017**) послата је на софтверску проверу оригиналности дана 26. септембра 2024. године. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио 27. септембра 2024. године. На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и резултата провере оригиналности, која је урађена у програму *iThenticate*, констатовано је да индекс подударности текста докторске дисертације „Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома“ аутора Ане Р. Деспотовић, износи 9 %. Детаљним увидом у извештај утврђено је да подударане ни са једним извором није веће од 1%, а да је степен највећег броја подударанја мањи од 1%. Подударност је последица препознавања стандардних елемената докторских дисертација (афилијација институција, личних имена, пуних назива скраћеница, реагенаса, једињења) као и општих појмова и синтагми карактеристичних за научно-истраживачки рад. Уочена преклапања низа речи у реченицама не чине смислен израз.

Из свега наведеног, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, Извештај указује на оригиналност докторске дисертације под насловом „Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома“, аутора Ане Р. Деспотовић. Комисија сматра да се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Након увида у докторску дисертацију кандидата **Ане Р. Деспотовић**, под насловом „Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома“, као и увида у научне публикације проистекле из ове докторске дисертације, Комисија закључује да приложена докторска дисертација представља оригинални научни допринос у области биологије малигне ћелије. Квалитет ове докторске дисертације и значај добијених резултата огледа се у проширењу сазнања о молекуларним механизмима које у малигним ћелијама покреће комбинација АК+МД, а посебно у приказаном

цитотоксичном ефекту према ћелијама глиобластома, као и открићу да се модулацијом активности аутофагије и АКТ и JNK киназа може појачати токсичност ових третмана у култури глиобластомских ћелија. Ова сазнања отварају могућност даљег изучавања МД и АК+МД заједно са модулаторима аутофагије и малим молекулским инхибиторима 10-DEBC и SP600125, у циљу проналаска најефикаснијег терапијског решења и превазилажења резистенције глиобластома на конвенционалну терапију. Докторска дисертација је реализована у складу са образложењима наведеним приликом пријаве теме. У потпуности одговара принципима научно-истраживачког рада и садржи све прописане елементе који су потребни за завршетак докторске дисертације. Јасно дефинисани циљеви постављени на почетку израде дисертације су, применом адекватно одабраних методолошких приступа, успешно реализовани. Добијени резултати су јасно приказани, у складу су са постављеним циљевима и критички су дискутовани. Из добијених резултата су донети закључци који у потпуности одговарају постављеним циљевима.

Резултати истраживања ове дисертације су објављени у међународним часописима категорије M21, у оквиру два оригинална научна рада у којима је Ана Р. Деспотовић први аутор.

Узимајући у обзир то да је кандидат **Ана Р. Деспотовић** испунила све формалне услове неопходне за одбрану докторске дисертације под насловом **„Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома“**, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да овај извештај усвоји и одобри **Ани Р. Деспотовић** јавну одбрану докторске дисертације.

У Београду, 30. 9. 2024. године

КОМИСИЈА:

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

др Кристина Јањетовић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Тања Јевђовић, ванредни професор
Универзитет у Београду
Биолошки факултет



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

42/31 - 11. 4. 2023.

На основу члана 93. став 4. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета и члана 24а став 3. Правилника о докторским студијама на Универзитету у Београду-Биолошком факултету, број 15/297 од 20. 5. 2014. године, а на захтев Ане Р. Деспотовић, студента докторских студија, Наставно-научно веће Факултета, на VI редовној седници одржаној 11. 4. 2023. године, донело је

ОДЛУКУ

Ани Р. Деспотовић, Б3024/2017, студенту докторских студија на Биолошком факултету у Београду, одобрава се продужетак рока за завршетак студија најкасније до истека рока у троструком броју школских година потребних за реализацију студијског програма, односно до 30. 9. 2026. године.

Образложење

Ана Р. Деспотовић, уписала је докторске студије на Биолошком факултету у Београду школске 2017/2018. године.

Пре истека наведеног рока, 30. 9. 2023. године, именована је поднела захтев Наставно-научном већу Факултета да јој се продужи рок за завршетак студија у складу са Статутом Факултета наводећи као разлог проблеме до којих је дошло у процесу завршетка докторске дисертације.

Чланом 101. став 4. Статута Универзитета у Београду прописано је да се студенту на лични захтев, поднет пре истека рока из ст. 1. и 2. овог члана, односно, двоструког броја школских година потребних за реализацију студијског програма, може продужити рок за завршетак студија до истека рока у троструком броју школских година потребних за реализацију студијског програма.

На основу наведеног донета је одлука као у диспозитиву.



Председник ННВ, Декан Факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић