

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИМЛЈЕНО		06.09.2023	
Број:	05	8674	Врста:

## 1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној 13.07.2023. године, одлуком бр. IV-03-502/18 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „Ефекти системске апликације PL-33 на прогресију мишјег меланома“ кандидата др Андре Јевтовића, у следећем саставу:

1. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник;
2. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан;
3. **Проф. др Иван Јовановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију кандидата др Андре Јевтовића и подноси Наставно-научном већу следећи

## 2. Извештај комисије о оцени и одбрани завршене докторске дисертације

### 2.1. Опис докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата др Андре Јевтовића под називом „Ефекти системске апликације PL-33 на прогресију мишјег меланома“, урађена под менторством проф. др Гордане Радосављевић, редовног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, представља оригиналну научну студију која се бави ефектима системске апликације PL-33 на прогресију мишјег меланома, као и на модулацију антитуморског имунског одговора против меланома.

У уводном делу и теоретском разматрању, кандидат је цитирајући релевантну литературу јасно и прецизно изложио досадашње актуелне информације које се односе на онкогенезу, прогресију и метастазирање меланома, сингене трансплантационе моделе за

испитивање прогресије меланома, улогу антитуморског имунског одговора у меланому, механизме избегавања имунског одговора против меланома, имунотерапију меланома, као и на опште карактеристике IL-33 и његову улогу у биологији и терапији тумора.

Циљеви и хипотезе су јасно дефинисани и изложени, и у складу су са одобреном пријавом тезе. Циљ студије је био да се испитају ефекти системске апликације IL-33 на прогресију мишјег меланома, као и на модулацију имунског одговора против меланома.

Истраживање је спроведено на мишевима чистог соја C57BL/6. У студији су коришћене туморске ћелије B16-F1 и B16-F10, које представљају варијетете мишјег меланома са ниским (B16-F1) и високим (B16-F10) метастатским потенцијалом. Различитим модалитетима апликације мишјег рекомбинантног IL-33, испитиван је ефекат IL-33 у примарном и метастатском меланому. Патохистолошка верификација плућних метастаза урађена је на ткивним пресецима са пет нивоа. Методом имунохистохемије анализирана је експресија IL-33 и ST2 у примарном тумору и у плућима са метастазама. Испитане су фенотипске и функционалне карактеристике леукоцита изолованих из плућа коришћењем проточне цитометрије. Магнетном сепарацијом издвојени су CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити из плућа, након чега је на апарату *Roche xCELLigence RTCA* анализиран цитотоксички капацитет CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита. *Real-time PCR* методом испитана је експресија iRNK за синтезу IL-33, ST2, MHC1 и TAP1 у B16-F1 ћелијама, док је анализа цитокинског миљеа у плућима са метастазама спроведена након амплификације секвенце гена за Foxp3, IL-10 и TGF-β. У циљу утврђивања релевантности ефекта забележеног на мишјем моделу меланома, колориметријском методом *ELISA* анализирана је концентрација IL-33 у серуму 72 пацијента оболела од меланома.

Резултати истраживања су систематично приказани и јасно документовани графиконима (укупно 33) и сликама (укупно 9). Приказ резултата је прегледан и разумљив. Упркос томе што ефикасно инхибира раст примарног мишјег меланома са различитим метастатским капацитетом (B16-F1 и B16-F10), IL-33 индукује експанзиван раст плућних метастаза B16-F1 варијетета меланома са slabим метастатским потенцијалом. Мишеви којима је апликован IL-33 појачано експримирају рецептор ST2 у метастатском ткиву, док у примарном тумору повећано исказују IL-33. IL-33 у плућима повећава заступљеност тумороцидних еозинофила и NK ћелија и смањује удео дендритских ћелија али не утиче на њихов активациони статус. Повећањем експресије инхибиционих рецептора на цитотоксичким CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима и редукцијом њиховог цитотоксичког капацитета, IL-33 слаби њихову туморицидну активност. Прометастатском ефекту IL-33 додатно доприноси редукција имуногености B16-F1 ћелија и подстицање имуносупресивне микросредине у метастатском ткиву плућа. Код пацијената у узнапредованом стадијуму меланома регистрована је повећана концентрација IL-33 у серуму.

У поглављу „Дискусија“ детаљно су објашњени резултати актуелног истраживања и коментарисани су у односу на резултате претходно објављених студија.

## 2.2. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Меланом је један од најагресивнијих тумора који карактеришу брзи раст и рана дисеминација метастатских ћелија, као и резистенција на постојеће терапијске агенсе. Настанак и прогресија меланома је сложен и динамичан процес који је резултат постепене акумулације генских мутација, а главне фазе овог процеса су малигна трансформација меланоцита у бенигне меланицитне младеже, развој диспластичног младежа, фаза радијалног и вертикалног раста примарног меланома и на крају дисеминација метастатских меланоцита и успостављање удаљених метастаза.

Меланом карактерише и висок степен имуногености јер малигни меланоцити на својој површини експримирају неоантигене који покрећу урођени и специфични антитуморски имунски одговор. Елиминацијом малигно трансформисаних меланоцита, имунски систем игра важну улогу у превенцији појаве и развоја меланома. Ефикасност имунског одговора против меланома захтева брзу активацију неспецифичних механизма урођене имуности који осим елиминације генетски измењених ћелија, покрећу и специфичне механизме стечене имуности. Захваљујући бројним механизмима којим ћелије меланома избегавају имунски надзор, метастатски меланом расте и дисеминује се упркос својим имуногеним карактеристикама.

До сада су развијени бројни модалитети имуноterapiје метастатског меланома базирани на цитокинској терапији IL-2 и IFN- $\alpha$ , молекулској циљаној терапији инхибиторима B-raf и MEK, "checkpoint" блокади анти-CTLA-4 и анти-PD-1 антителима, као и на локалној терапији онколитичким вирусима. И поред напретка у имуноterapiји метастатског меланома, развој туморске резистенције и присуство бројних системских нежељених дејстава представљају главне препреке у лечењу метастатске болести.

IL-33 је мултифункционални цитокин фамилије интерлеукина-1 који учествује у регулацији урођеног и стеченог имунског одговора. Своје биолошке функције IL-33 остварује тако што се везује за рецепторски комплекс кога чине молекула ST2 и акцесорски протеин рецептора за IL-1. Иако првенствено подстиче тип 2 имунског одговора, у одговарајућем цитокинском миљеу и инфламацијским условима мења се експресија молекула ST2 на ћелијама имунског система што за последицу има конверзију ефеката IL-33 и поларизацију у смеру Th1 имунског одговора. С тога на комплексну улогу IL-33 у различитим инфламацијским, аутоимунским и инфективним обољењима утичу сложене интеракције ћелија имунског система, као и експресија IL-33 и његовог рецептора у различитим ћелијама и ткивима.

IL-33 игра сложену улогу у генези, прогресији и контроли тумора. У зависности од микроокружења и типа тумора, IL-33 са једне стране може да фаворизује раст и прогресију тумора, док у другим околностима подстиче антитуморски имунски одговор. Имајући у виду наведене чињенице циљ ове студије био је да се утврде ефекти системске апликације IL-33 у зависности од метастатског потенцијала и стадијума мишјег меланома у циљу додатне евалуације његове потенцијалне системске примене у терапији меланома.

### **2.3. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области**

Претрагом доступне литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података „Medline” и „KoBSON”, уз коришћење одговарајућих кључних речи: „Melanoma”, „IL-33”, „metastasis”, „CD8<sup>+</sup> T cells”, нису пронађене студије истог дизајна и методолошког приступа. Сходно наведеном, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата др Андре Јевтовића под називом „Ефекти системске апликације ИЛ-33 на прогресију мишјег меланома“ представља резултат оригиналног научног рада.

### **2.4. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области**

#### **А. Лични подаци**

Андре Јевтовић, доктор медицине, рођен је 07.12.1986. године у Крагујевцу. Завршио је основну школу „Радоје Домановић“ у Крагујевцу, а након тога Прву крагујевачку гимназију. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписао је школске 2005/2006. године, а дипломирао 06.07.2012. године на студијском програму Интегрисане академске студије медицине са просечном оценом 9.55. Стручни испит је положио 22.04.2013. године. Школске 2013/2014. године је уписао Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, на изборном подручју Имунологија, инфекција и инфламација. 15.12.2016. године је положио усмени докторски испит са оценом 10. Од 2016. године запослен је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, где и данас обавља послове сарадника у звању асистента за ужу научну област Оториноларингологија. Од 2014. године запослен је у Универзитетском клиничком центру Крагујевац, на Клиници за Оториноларингологију. Специјалистичке студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, из гране медицине Оториноларингологија, уписао је 06.04.2017. године. и положио је специјалистички испит 13.05.2021. године са оценом одличан (пет).

Аутор је и коаутор више оригиналних научних радова у часописима од међународног и националног значаја са рецензијом. Резултати рада наведени под редним бројем 1 саставни су део докторске дисертације, чиме је кандидат испунио услов за одбрану докторске дисертације.

#### **Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)**

1. Jevtovic A, Pantic J, Jovanovic I, Milovanovic M, Stanojevic I, Vojvodic D, Arsenijevic N, Lukic ML, Radosavljevic GD. Interleukin-33 Pretreatment Promotes Metastatic Growth of

Murine Melanoma by Reducing the Cytotoxic Capacity of CD8 + T Cells and Enhancing Regulatory T Cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(8):1461-1475. (M21)

2. Skuletic V, Radosavljevic GD, Pantic J, Markovic BS, Jovanovic I, Jankovic N, Petrovic D, Jevtovic A, Dzodic R, Arsenijevic N. Angiogenic and lymphangiogenic profiles in histological variants of papillary thyroid carcinoma. *Pol Arch Intern Med.* 2017;127(6):429-437. (M21)

3. Benazic S, Besser Silconi Z, Jevtovic A, Jurisevic M, Milovanovic J, Mijajlovic M, Nikolic M, Kanjevac T, Potočňák I, Samořová E, Ratkovic ZR, Radic G, Milovanovic M, Pantic J, Arsenijevic N, Radosavljevic GD. The Zn( S-pr-thiosal) 2 Complex Attenuates Murine Breast Cancer Growth by Inducing Apoptosis and G1/S Cell Cycle Arrest. *Future Med Chem.* 2020;12(10):897-914. (M21)

## 2.5. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Спроведено истраживање је у потпуности усклађено са пријавом теме докторске дисертације. Циљеви истраживања и примењена методологија су идентични са одобреним у пријави тезе. Докторска дисертација кандидата др Андре Јевтовића садржи следећа поглавља: Увод, Циљ рада, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључак, Скраћенице и Литература. Теза је написана је на 119 страна и садржи 15 слика, 33 графикана и 1 табелу. Поглавље Литература садржи 544 цитираних библиографских јединица из иностраних и домаћих стручних публикација.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација кандидата др Андре Јевтовића под називом „Ефекти системске апликације ИЛ-33 на прогресију мишјег меланома“, по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

## 2.6. Научни резултати докторске дисертације

ИЛ-33 са једне стране, ефикасно редукује раст примарног тумора, док с друге стране, подстиче експанзиван раст метастатских колонија. ИЛ-33 своју прометастатску активност остварује тако што редукује туморицидну активност цитотоксичких CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита и креира имуносупресивну микросредину у плућима, што све заједно погодује прогресивном расту метастатских колонија меланома. Погодан учинак ИЛ-33 на метастазирање додатно је потврђен и налазом повећане концентрације ИЛ-33 у серуму оболелих од меланома са детектованим регионалним метастазама. Забележени дуални ефекат системске апликације ИЛ-33 може да лимитира његову потенцијалну примену у имунотерапији тумора.

Најзначајнији резултати истраживања су садржани у следећим закључцима:

1. ИЛ-33 редукује раст примарног тумора код оба варијетета малигних меланоцита (В16-Ф1 и В16-Ф10), а нарочито В16-Ф1 ћелијског варијетета са мањим метастатским потенцијалом

2. IL-33 остварује и јасан прометастатски ефекат који се огледа у интензивном расту хематогених метастаза B16-F1 варијетета меланома у плућима
3. Излагање B16-F1 ћелија IL-33 индукује повећану експресију iRNK за рецептор овог цитокина, ST2
4. Интраперитонеална апликација IL-33 индукује повећану експресију рецептора ST2, како на метастатским меланоцитима тако и на ћелијама имунског система у плућима мишева са експерименталним метастазама
5. Интраперитонеална апликација IL-33 за последицу има повећану експресију IL-33 на туморским ћелијама примарног меланома, док је у плућима са успостављеним метастазама оваква експресија ограничена на ћелије имунског система
6. Концентрација IL-33 у серуму оболелих од меланома се повећава са прогресијом болести што додатно потврђује његову прометастатску улогу
7. Мада системска апликација IL-33 подстиче урођени имунски одговор на меланом који одликује повећани удео NK ћелија са антитуморским фенотипом у плућима, јасно је да он није довољно ефикасан у борби против хематогених метастаза
8. Иако интраперитонеална апликација IL-33 смањује заступљеност дендритских ћелија током антитуморског имунског одговора, притом не мењајући њихов активациони статус, IL-33 сузбија стечену имуност тако што смањује цитотоксичност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита и фаворизује имуносупресивни фенотип ових ћелија
9. Измењена регулација стеченог антимеланомског имунског одговора је барем делимично последица смањене имуногености B16-F1 ћелија након излагања IL-33, а огледа се у смањеној експресији iRNK за МНС молекула I класе и iRNK за TAP1
10. Прометастатска активност IL-33 се манифестује и способношћу овог цитокина да креира имуносупресивну микросредину у метастатском меланому: интраперитонеална апликација IL-33 узрокује акумулацију MDSCs и регулаторних Т лимфоцита, као и повећану експресију iRNK за синтезу транскрипционог фактора FoxP3 и цитокина IL-10 и TGF- $\beta$  у плућима.

## 2.7. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Резултати овог истраживања дају оригиналан и важан допринос разумевању ефеката системске апликације IL-33 у прогресији мишјег меланома. Добијени резултати указују да, упркос супресивном деловању на раст примарног меланома, IL-33 подстиче раст хематогених метастаза у мишјем меланому тако што слаби ефикасност механизма стечене имуности што доводи у питање његову евентуалну терапијску примену.

## 2.8. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати ове студије публиковани су као оригинално истраживање у часопису индексираном на SCI листи (категирија M21):

**Jevtovic A, Pantic J, Jovanovic I, Milovanovic M, Stanojevic I, Vojvodic D, Arsenijevic N, Lukic ML, Radosavljevic GD. Interleukin-33 Pretreatment Promotes Metastatic Growth of Murine Melanoma by Reducing the Cytotoxic Capacity of CD8 + T Cells and Enhancing Regulatory T Cells. Cancer Immunol Immunother. 2020;69(8):1461-1475.**

## ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др Андре Јевтовића под називом „Ефекти системске апликације IL-33 на прогресију мишјег меланома“ сматра да је истраживање базирано на релевантним сазнањима и валидној методологији и да је прецизно и адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата др Андре Јевтовића под менторством проф. др Гордане Радосављевић, редовног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, представља оригинални научни допринос испитивању ефеката системске апликације IL-33 на прогресију мишјег меланома.

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом „Ефекти системске апликације IL-33 на прогресију мишјег меланома“, кандидата др Андре Јевтовића буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

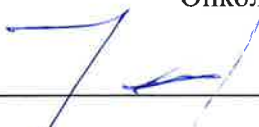
**Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник



**Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан



**Проф. др Иван Јовановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан



У Крагујевцу, август 2023. године