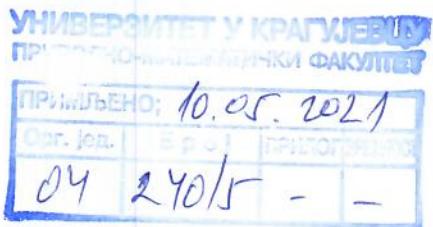




Инцидент се овога пута
је. Асанџић

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ВЕЋУ ЗА ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКЕ НАУКЕ
УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ



На седници Наставно-научног већа Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу одржаној 31.03.2021. године (број одлуке 190/XV-2) и на седници Већа за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу одржаној 14.04.2021. године (број одлуке IV-01-277/16), формирана је Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата Александре Г. Никезић и предложеног ментора за израду докторске дисертације под називом „Епигенетичка регулација експресије гена укључених у малигну трансформацију и инвазију тумора јајника“, у следећем саставу:

- 1) Др Татјана Љ. Митровић, редовни професор; **председник Комисије**
Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет
Ужа научна област: Експериментална биологија и биотехнологија;
- 2) Др Снежана Д. Марковић, доцент; **предложени ментор**
Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
Ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија;
- 3) Др Данијела В. Тодоровић, ванредни професор; **члан Комисије**
Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука
Ужа научна област: Генетика;
- 4) Др Милош М. Матић, доцент; **члан Комисије**
Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
Ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија;
- 5) Др Петар С. Арсенијевић, доцент; **члан Комисије**
Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука
Ужа научна област: Гинекологија и акушерство.



На основу података којима располажемо достављамо следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације и процена научног доприноса крајњег исхода рада.

Тумор или неоплазму чини скуп изменењених ћелија које одликује убрзан и неконтролисан раст некоординисан са околним здравим ткивом. Тумори код људи настају као резултат нагомиланих генетичких и епигенетичких промена унутар појединачних ћелија, због којих се ћелија неконтролисано дели. Тумори могу бити бенигни, потенцијално малигни (преканцерозна стања) и малигни. Према клиничкој слици и молекуларно-генетичким аномалностима, **тумор јајника** се може класификовати у два типа. Тумори типа I укључују *low-grade* серозне карциноме, *borderline* серозне туморе, *low-grade* ендометриоиде, муцинозне и светлоћелијске карциноме. У туморе типа II спадају *high-grade* серозни карциноми, карциносаркоми и недиференцирани карциноми. Тумори типа II обухватају око 70% свих епителних тумора, врло су агресивни и најчешће се дијагностишу у последњим стадијумима. У тренутку испољавања одликује их велика нестабилност генома и код 95% пацијената мутiran је ген *TP53* (*Tumor Protein p53*). Карактеришу их и честе мутације на *BRCA1* и *BRCA2* генима.

Епигеномика се бави проучавањем целокупног сета епигенетичких модификација на геному, тзв епигеном. Епигеном представља скуп информација које се читају на нивоу хистонског кода, метилационог статуса ДНК секвенци и регулације хроматина помоћу малих некодирајућих РНК. Епигеном је укључен у регулацију структуре хроматина, експресије гена, развој и диференцијацију ткива. Метилација ДНК, модификације хистона и миРНК заједно формирају епигенетички профил ткива која промовишу туморогенезу. **Епигенетика** је наука која проучава реверзибилне наследне промене које доводе до активације или деактивације гена, а које нису узорковане структурним променама у нуклеотидној секвенци. Метилације хистона и ДНК инхибирају експресију тумор супресор гена транскрипционом инхибицијом. Од аминокиселинских остатака у хистонима, лизини су најподложнији епигеномским модификацијама: метилацији, ацетилацији, фосфорилацији, сумоилацији и убиквитинацији. Гени који имају CpG острва су подложнији епигенетичким модификацијама, а најчешће долази до метилације ДНК. ДНК метилтрансфераза (енгл. *DNA methyltransferase*, DNMT) препознаје CpG места и метилује цитозин, претварајући га у 5-метилцитозин. Епигенетичке модификације су потенцијалне мете у лечењу тумора, обзиром да се епигенетички статус може мењати таргет терапијом у циљу активације тумор супресор гена или инхибиције онкогена. Најважније ДНК метилтрансферазе су DNMT1, DNMT3a и DNMT3b. DNMT1 је најзаступљенија и има улогу у наследном одржавању обрасца метилације док су друге две метилтрансферазе посредници *de novo* метилације. Промене у генској експресији DNMT повезане су са резистенцијом на хемотерапеутике код канцера дојке. Такође, одређени полиморфизми појединачних нуклеотида на *DNMT1* гену повећавају ризик од настанка тумора јајника. Абнормална експресија и аберантна функција DNMT1, DNMT3a и DNMT3b утичу на промену обрасца експресије гена одговорних за настанак и прогресију различитих типова тумора. Анализа експресије и полиморфизма *DNMT* гена на модел систему генома изолованог из бенигних и малигних тумора јајника, значајно доприноси разумевању утицаја епигенетике на етиологију болести, откривању потенцијалних тумор маркера и таргета у терапији. Анализа епигенетичке регулације експресије онкогена, тумор супресор гена и миРНК укључених у процесе малигне трансформације и инвазије тумора јајника може имати практичну примену у раној детекцији болести, молекуларно типизацији тумора јајника, јаснијој молекуларној основи и разлици у обрасцима генске



експресије у бенигном и малигном ткиву тумора јајника као и индивидуализованом приступу лечења пацијената.

У иницијалној фази трансформације здраве ћелије у туморску, кључну улогу имају гени чији протеински производи регулишу ћелијски циклус. Основна улога циклин-зависних киназа (енгл. *Cyclin-dependent kinases*, CDKs) је регулација ћелијског циклуса, и оне спадају у фамилију серин/треонин киназа. Активирају се везивањем циклина за катализичку регулаторну субјединицу. CDK1 регулише G2 фазу ћелијског циклуса као део комплекса са циклином А и укључена је у прелазак G2/M фазу формирајући комплекс са циклином Б. Експресија *CDK1* је повишена у многим туморима и може се користити у циљаној терапији, потенцијално инхибирати напредак ћелијског циклуса и индуковати апоптозу. CDK2 има кључну улогу у регулацији ћелијског циклуса и преласку ћелије из G1/S фазу, укључена је у низ биолошких процеса као што су оштећење ДНК, унутарћелијски транспорт, трансдукција сигнала и метаболизам. Укључена је у прогресију канцера и убрзану пролиферацију ћелија. Показано је да постоји корелација између хипометилијације и повишене експресије *CDK2* у канцеру оваријума. Повећана експресија *CDK16* доказана је у различитим типовима тумора. На тумору јајника је рађена само једна студија која је анализирала експресију *CDK16* у здравом и туморском ткиву јајника, а резултати су показали статистички значајно повишен ниво генске и протеинске експресије у серозном епителном карциному јајника, стога је ово недовољно испитано и актуелно поље истраживања.

Већина мутација детектованих у туморима јајника су соматске мутације. Међутим, око 10% тумора јајника имају наследне генетичке мутације у *BRCA1* и *BRCA2* генима. Експресија *BRCA1* је фаворизована у односу на експресију *BRCA2* са повећањем стадијума раста канцера. У туморима јајника хиперметилација *BRCA1* је честа код спонтаних карцинома дојке и јајника. Деметилација *BRCA1* смањује хемосензибилност ћелија које су осетљиве на платину, стога, хиперметилација *BRCA1* фаворизује осетљивост на лечење. Познато је да *BRCA* гени имају много бројне улоге у организму, док се у неким радовима полиморфизми и смањена експресија сматрају одговорним за повећан ризик од настанка тумора. Са друге стране, њихова повишене експресије може узроковати резистенцију на хемотерапеутике. Сегмент докторске дисертације који ће се бавити овом тематиком може знатно допринети разумевању обрасца експресије и епигенетичке улоге у регулацији експресије *BRCA* гена у ткивима тумора јајника жена из Републике Србије.

Апоптоза или програмирана ћелијска смрт туморских ћелија је крајњи механизам дејства многих терапеутика. Фамилија *Bcl-cell lymphoma 2* (Bcl-2) гена има важну улогу у апоптози и блиско је повезана са хеморезистенцијом код тумора јајника. Неки лекови који циљају гене из Bcl-2 фамилије показали су ефикасност у превазилажењу хеморезистенције малигних тумора јајника. Bcl-2 фамилија протеина регулише пропустљивост мембрANE митохондрија, и може имати про-апоптотски (Bax, Bad) или анти-апоптотски ефекат (Bcl-2, Bcl-xL). Карактеристика чланова ове породице је њихова способност честог формирања хомо и хетеродимера. Хетеродимеризацијом између анти-апоптотских и про-апоптотских протеина, инхибира се биолошка активност једног од протеина. Ово је важан процес и у испитивању потенцијалних фитотерапеутика на имортализованим ћелијским линијама, што је један од аспекта доктората у циљу увођења туморских ћелија у апоптозу и проналажења биоактивних једињења која немају штетан утицај на здраве ћелије.

Једна од најважнијих карактеристика малигних тумора јајника је инвазија и метастаза. Познато је да металопротеиназе матрикса (енгл. *Matrix metalloproteinase*, MMP) имају важну улогу у инвазији ћелија карцинома посредујући у разградњи екстраћелијског матрикса. Повишене експресије MMP9 је повезана са лошом прогнозом и тежим стадијумом болести. Испитивање гена који регулишу инвазију ћелија је изузетно важно за спречавање напредовања болести и превенцију епително-мезенхималне транзиције која води миграцији ћелија и формирању удаљених метастаза. MMP и TGF-β (енгл. *Transforming growth factor beta*) међусобно интерагују на два начина. TGF-β је мултифункционални цитокин кога синтетишу сви леукоцити и лимфоцити. Ствара се као латентни инактивни протеин у екстраћелијском матриксу а протеолитички се може активирати металопротеиназом. Ослобођени активни протеин може, затим, инхибирати или поспособити раст туморских ћелија и инвазивност, у зависности од стадијума тумора. Са друге стране, TGF-β регулише



експресију MMP и њихових ткивних инхибитора TIMP (енгл. *Tissue inhibitors of metalloproteinases*) у туморским и стромалним ћелијама. Промене у TGF-β сигналном путу доказане су у многим болестима попут солидних и хематопоетских тумора људи. Протеин иницијално делује као инхибитор пролиферације ћелија, и тумор супресор; међутим, у каснијим стадијумима тумора губи антитролиферативну улогу и постаје онкогени фактор. Активни транскрипциони фактори NF-κB (енгл. *Nuclear Factor kappaB*) сигналног пута утичу на транскрипцију специфичних циљних гена укључених у широк спектар ћелијских функција, укључујући пролиферацију, ангиогенезу и метастазу. Мултифункционални транскрипциони фактор NF-κB експримиран је у многим типовима туморског ткива укључујући карциноме дојке, дебelog црева, плућа и јајника. Има важну улогу у инфламаторном одговору, имунитету, развоју и прогресији тумора. Промовише инвазију тумора прекомерном експресијом циљних гена MMP2 и MMP9.

Експресија одређених миРНК у тумору јајника регулисана је епигенетички. Промоторске секвенце гена који их кодирају могу бити хиперметиловане и на тај начин супримирати њихову експресију. Молекул miR-193a-3p делује као тумор супресор циљајући различите гене који су укључени у пролиферацију, апоптозу, миграцију, инвазију и метастазу тумора. Доказано је да регулише ћелијски циклус и апоптозу у епителном карциному јајника. Једна студија је показала тумор специфичну хиперметилизацију гена за miR-107 и miR-130b у односу на здраво ткиво јајника, што потенцијално може бити тумор маркер. Анализа метилационог статуса гена који кодирају описане миРНК може допринети разумевању њиховог утицаја на прогресију и инвазију тумора јајника.

Антитуморски потенцијал различитих биљних екстраката или изолованих фенола може се пратити кроз њихову антитролиферативну и проапоптотску активност, антиинвазивни потенцијал, ефекат на редокс статус у ћелијама. Биоактивне супстанце могу бити коришћене у третману или ко-третману са различitim хемотерапеутицима смањујући њихове нежељене ефекте. Природна једињења су показала снажна фармаколошка својства, која укључују антиинфламаторно, антитролиферативно, антитуморско, цитопротективно, проапоптотско, антиоксидационо, хемопревентивно, итд., на различитим ћелијским линијама и модел системима. Синергистичко деловање природних једињења у биљном екстракту може допринети њиховој јачој биоактивности. Наведени сегмент доктората бави се откривањем нових природних једињења са антитуморским својствима која могу допринети лечењу тумора јајника без нежељених ефеката на здраве ћелије.

Истраживања у оквиру предложене докторске дисертације биће реализована кроз два сегмента. У првом делу, истраживања ће бити фокусирана на анализу експресије и полиморфизама DNMT гена одговорних за процес метилизације ДНК, затим епигенетичку регулацију експресије онкогена, тумор супресор гена и миРНК укључених у процесе малигне трансформације и инвазије тумора јајника. Други сегмент дисертације обухвата *in vitro* испитивања антитуморског деловања биоактивних супстанци врсте *Alchemilla vulgaris* L. на имортализованим ћелијским линијама јајника (OVCAR-3) и дојке (MDA-MB-231, MDA-MB-468).

Веза са досадашњим истраживањем

Претраживањем и анализом релевантне литературе утврђено је да је механизам епигенетичке регулације генске експресије у различитим типовима тумора, актуелно и недовољно испитано поље истраживања. Резултати дисертације могу допринети откривању потенцијалних тумор маркера у раној детекцији болести, типизацији тумора и јаснијој молекуларној основи, као и разлици у епигенетичкој регулацији обрасца генске експресије у бенигном и малигном ткиву тумора јајника. Допринос је такође, у индивидуализованом лечењу тумора јајника на основу епигенетичког профила гена који регулишу кључне процесе одговорне за малигну трансформацију здраве у туморску ћелију, каснију инвазију ћелија и формирање удаљених метастаза. Промене у експресији и нуклеотидној секвенци гена који кодирају ензиме DNMT предмет су истраживања на различитим типовима тумора, а досадашња истраживања их повезују са резистенцијом на хемотерапеутике и повећаним ризиком од настанка и прогресије тумора. Малигни тумори јајника су један од три најчешћа гинеколошка канцера, врло су агресивни и најчешће се дијагностишују у последњим стадијумима, стога имају највећу стопу смртности. Епигенетичке модификације су потенцијалне мете у лечењу тумора, обзиром да се



епигенетички статус може мењати таргет терапијом у циљу регулације аберантно експримираних онкогена и/или тумор супресор гена.

2. Образложение предмета, метода и циља који уверљиво упућују да је предложена тема од значаја за развој науке.

Предмет докторске дисертације је анализа експресије и полиморфизама *DNMT* гена одговорних за процес метилације ДНК у циљу откривања нових тумор маркера за превенцију, рану детекцију или типизацију тумора. Анализа епигенетичке регулације експресије онкогена, тумор супресор гена, апоптотских гена, и миРНК укључених у процесе малигне трансформације и инвазије тумора јајника. Преклиничко тестирање биолошки активних једињења из врсте *A. vulgaris* на различите сигналне путеве *in vitro*, у циљу идентификације природног суплемента у антитуморској терапији.

Хипотезе докторске дисертације

- Формирање биобанки ткива, генома и транскриптома бенигних и малигних тумора јајника омогућава трајно чување и доступност материјала за истраживање.
- Ниво експресије *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* гена, одговорних за метилацију ДНК, разликује се између бенигних и малигних тумора јајника. Испитивање полиморфизама *DNMT* гена омогућава дефинисање потенцијалних тумор маркера за превенцију, рану детекцију или типизацију тумора.
- Ниво експресије гена одговорних за настанак тумора јајника укључених у процесе регулације ћелијског циклуса (*CDK1*, *CDK2*, *CDK16*), и апоптозе (*Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Bax*, *Bad*) се разликује између бенигних и малигних тумора јајника.
- Ниво експресије *TGF-β*, *NF-kB*, *MMP2*, *MMP9* гена одговорних за инвазију малигних тумора јајника, разликује се између бенигних и малигних тумора јајника.
- Хипометилација онкогена (*CDK2...*) узрокује њихову повишену експресију док хиперметилација промоторског региона тумор супресор гена (*BRCA1...*) инхибира њихову експресију у ткивима тумора јајника.
- Ниво експресије циљаних миРНК (miR-193a-3p, miR-107 и miR-130b) се разликује између бенигних и малигних тумора јајника. Експресија miR-193a-3p, miR-107 и miR-130b је смањена у малигним туморима јајника у односу на бенигно ткиво услед хиперметилације промоторског региона гена који их кодира и представља потенцијални дијагностички маркер.
- Анализа сигналних путева на имортализованим ћелијским линијама карцинома јајника и дојке омогућава испитивање антитуморског деловања биоактивних супстанци и њихову потенцијалну примену у третману или котретману.

Циљ докторске дисертације је испитивање епигенетичке регулације експресије гена уључених у малигну трансформацију (онкогени, тумор супресор гени, апоптотски гени) и инвазију тумора јајника. Испитивање експресије и полиморфизама гена који кодирају ДНК метилтрансферазе (DNMT) и анализа метилационог статуса циљних гена.

Специфични циљеви:

А. Формирати биобанке генома и транскриптома из ткива бенигних и малигних тумора хуманих јајника са циљем:

- Анализе експресије гена одговорних за метилацију ДНК (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*) и полиморфизама *DNMT* гена у циљу дефинисања потенцијалног тумор маркера за превенцију, рану детекцију или типизацију тумора.



- Анализе релативне експресије гена укључених у процесе регулације ћелијског циклуса (*CDK1, CDK2, CDK16*), апоптозе (*Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bad*) и инвазије ћелија (*TGF-β, NF-κB, MMP2, MMP9*).
- Анализе метилационог статуса онкогена (*CDK2...*) и тумор супресор гена (*BRCA1...*), који су укључени у процес настанка и инвазије тумора јајника.
- Анализе експресије и метилациони статус гена за циљане миРНК молекуле (miR-193a-3p, miR-107 и miR-130b).

В. Анализирати *in vitro* антитуморски ефекат деловања фитотерапеутика на имортализованим ћелијским линијама карцинома јајника и дојке са аспекта молекуларних механизма малигне трансформације и инвазије ћелија.

Пацијенти и методологија рада

Ткива тумора јајника се прикупљају и анализирају у оквиру студије одобрене од стране Етичког одбора Клиничког центра у Крагујевцу (бр. 01-14-3042, 14.07.2019. године). Истраживање се обавља по типу контролисане клиничке експерименталне студије и спроводи на пациенткињама код којих је дијагностикован тумор јајника. Контролну групу чине пацијенкиње код којих је урађена хистеректомија због немалигних стања. У току хируршке интервенције, а уз добровољни пристанак пацијената (пацијенти су писмено и усмено информисани о свим детаљима Студије - потписан Информисани пристанак), лечећи гинеколог КЦ Крагујевац узима исечак туморског ткива јајника. Чување узорака ткива (на температури од -196 °C до извођења анализа) и даљи поступак са узорцима, као и формирање биобанки ткива, генома и транскриптома спроводи се у складу са принципима Европског истраживачког простора (Biobanks for Europe, 2012), а од стране истраживача Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

A. Модел систем геном и транскриптом изолован из ткива бенигних и малигних тумора јајника

Формирање биобанки генома и транскриптома из ткива бенигних и малигних тумора јајника се врши: (а) изолација геномске ДНК комерцијалним китовима за изолацију укупне ДНК из узорака, (б) изолација укупне РНК фенол-хлороформ методом.

Анализе:

- 1) Метода квантитативног PCR-а у реалном времену (енгл. *real-time qPCR*) се користи за праћење експресије гена одговорних за метилијацију ДНК, регулацију ћелијског циклуса, апоптозу и инвазију туморских ћелија, као и експресију миРНК, у транскрипту изолованом из ткива тумора јајника.
- 2) Из укупне ДНК изоловане из ткива јајника се амплификују *DNMT* гени, Multiplex PCR методом, при чему се добијени амплификати користе у испитивању полиморфизама гена. Детекција SNP-ова (енгл. *Single Nucleotide Polymorphisms*) једном од следећих метода: (а) полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената (енгл. *Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*); (б) TaqMan Real-time PCR анализом; (в) секвенцирање амплификованых циљаних гена.
- 3) Бисулфитна конверзија ДНК стандардним комерцијалним китом у циљу разликовања метилованих и неметилованих CpG острва циљних онкогена и тумор супресор гена, као и гена који кодирају циљне миРНК. Амплификација метилованих и неметилованих секвенци се врши метилијација-специфичном PCR методом и посебно дизајнираним прајмерима. Визуализација на гелу и/или методом секвенцирања.

Б. Модел систем имортализован ћелијске линије

Ћелијске линије које ће се користити у истраживању су OVCAR-3 (аденокарцином јајника), MDA-MB-231 (аденокарцином дојке), MDA-MB-468 (аденокарцином дојке). У третману ћелијских линија биће коришћен екстракт биљке *Alchemilla vulgaris*. Традиционално се користи као биљни чај или суплемент у исхрани код многих гинеколошких проблема.



Анализе:

- 1) Дефинисање антитуморског деловања третмана. Анализе цитотоксичности МТТ тестом, одређивање нивоа редокс статуса.
- 2) Метода квантитативног PCR у реалном времену (qPCR) се користи за праћење ефекта третмана на релативну експресију *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* гена одговорних за метилирању ДНК, гена укључених у процесе регулације ћелијског циклуса (*CDK1*, *CDK2*, *CDK16*), апоптозе (*Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Bax*, *Bad*) и инвазије ћелија (*TGF-β*, *NF-κB*, *MMP2*, *MMP9*), као и експресију миРНК (miR-193a-3p, miR-107 и miR-130b).
- 3) Испитивање ефеката третмана на протеинску експресију *BRCA1* и *MMP9* протеина имуноцитофлуоресцентном микроскопијом. Метода се базира на флуоресцентној детекцији специфичних антитела која се везују за циљани протеин.
- 4) Испитивање ефеката третмана на инвазивни потенцијал ћелија, методама *Wound healing assay* и/или *Transwell*.
- 5) Испитивање ефеката третмана на ензимску активност *MMP2* и *MMP9* методом желатинозне зимографије, која је заснована на електрофорези на полиакриламидном гелу и даје информацију о врсти металопротеиназе, релативној количини и активности ензима (латентно у поређењу са активним ензимским облицима) у гајеним ћелијама.

Оквирни садржај докторске дисертације

Предложена докторска дисертација садржаће следећа поглавља:

- 1) Увод
- 2) Циљ истраживања
- 3) Материјал и методе истраживања
- 4) Резултати
- 5) Дискусија
- 6) Закључци
- 7) Литература

Досадашња открића и актуелна истраживања која су у корелацији са темом докторске дисертације биће приказана у Уводу докторске дисертације. У овом поглављу кандидат ће описати: [а] анатомију и хормонску регулацију јајника, затим молекуларне механизме канцерогенезе, малигне трансформације и инвазије ћелија јајника; [б] епигенетичку улогу у регулацији експресије онкогена, тумор супресор и апоптотских гена, и миРНК чији протеински продукти регулишу претходно описане процесе [в] примену природних једињења у терапији тумора јајника и значај имортализованих ћелијских линија у преклиничким испитивањима. Циљ истраживања биће концизно описан на основу хипотеза докторске дисертације. Начин коришћења хуманог материјала, материјал и методе коришћени за доказивање хипотеза истраживања биће детаљно описани у поглављу Материјал и методе истраживања. Поглавље Резултати садржаће табеларни и/или графички приказ статистички обрађених резултата. Добијени резултати ће бити детаљно обrazложeni u поглављу Дискусија, са упоредном анализом литературних података. На основу добијених резултата истраживања, биће изведени појединачни и општи закључци. Поглавље Литература садржаће целокупан преглед литературе коришћене у докторској дисертацији.

3. Образложение теме за израду докторске дисертације које омогућава закључак да је у питању оригинална идеја или оригинални начин анализирања проблема.

Анализа експресије и полиморфизама *DNMT* гена на геному изолованом из бенигних и малигних тумора јајника пацијенткиња, могу допринети откривању потенцијалних тумор маркера у раној детекцији болести и



типализацији тумора. Ензими чија је улога у епигенетичкој модификацији ДНК молекула су такође и потенцијалне мете у лечењу тумора, обзиром да се епигенетички статус може мењати таргет терапијом у циљу регулације аберантно експримираних онкогена и тумор супресор гена. Резултати епигенетичке регулације кључних гена и миРНК укључених у процесе малигне трансформације и инвазије ћелија јајника, актуелно су поље истраживања и од изузетног су значаја за анализу настанка, тока и исхода болести, затим у профилисању ткива тумора јајника и индивидуализованом приступу лечењу тумора јајника на основу епигенетичког профила генома. Преклиничка испитивања на имортализованим ћелијским линијама омогућавају праћење ефекта терапије на различите сигналне путеве укључене у процесе канцерогенезе и прогресије тумора. На основу свега изнетог, закључујемо да је предложена тема „Епигенетичка регулација експресије гена укључених у малигну трансформацију и инвазију тумора јајника“ кандидата Александре Г. Никезић оригинална идеја. Очекивани резултати могу бити научно верификовани и публиковани у међународним научним часописима и на научним скуповима.

4. Усклађеност дефиниције предмета истраживања, основних појмова, предложене хипотезе, извора података, метода анализе са критеријумима науке уз поштовање научних принципа у изради коначне верзије докторске дисертације.

Кандидат Александра Никезић ће обухватити све елементе савременог научноистраживачког рада у току изrade своје докторске дисертације. Увидом у актуелну литературу, кандидат ће потврдити тачност својих хипотеза и поставити циљеве, изабрати адекватну методологију у истраживању и статистичкој обради резултата. Поштујући основне критеријуме науке и научних принципа, допринеће развоју научних идеја у области докторске дисертације. Научни допринос предложене докторске дисертације се базира на актуелним истраживањима, унапредиће сазнања о улози епигенетике у регулацији гена и миРНК укључених у процесе малигне трансформације и инвазије бенигних и малигних тумора јајника, као и утицај фитотерапије на имортализованим ћелијским линијама карцинома јајника и дојке.

5. Предложени ментор изrade докторске дисертације.

За ментора докторске дисертације кандидата Александре Никезић, Комисија предлаже др Снежану Марковић, доцента у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија. Доц. др Снежана Марковић се активно бави научноистраживачким радом и аутор/коautor је преко 68 научних радова (SCI листа; 1136 хетероцитата, χ индекс 15, извор SCOPUS) од значаја за развој научне мисли у оквиру Области. Од тога, преко 40 публикација су резултат испитивања биолошких ефеката и молекуларних механизама деловања биоактивних супстанци (хемијски синтетисаних и изолованих из природних материјала) на хуманим имортализованим ћелијским линијама канцера, као и разумевања молекуларних механизама малигнитета у хуманој популацији.

Доц. др Снежана Марковић се две деценије бави научно-наставним радом у областима Молекуларне биологије, биотехнологије и физиологије, а тренутно је наставник на 15 акредитованих предмета на свим нивоима студија. До сада је била ментор пет одбрањених докторских дисертација и преко 20 магистарских/ специјалистичких/ мастер/ дипломских радова из наведене научне области. Активно учествује у развоју молекуларне биологије и биотехнологије на Факултету, иницијатор је MAC програма Биологија – молекуларна биологија. Ангажована је у оснивању Центра изврсности за Преклиничка испитивања активних супстанци у оквиру FP7 пројекта CPCTAS, и оснивању нове Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију у оквиру Центра, која запошљава више младих истраживача и опремљена је најсавременијом опремом за испитивања у ћелијској и молекуларној биологији.



Имајући у виду циљеве и очекиване резултате ове докторске дисертације, као и поље истраживања предложеног ментора, Комисија сматра да доц. др Снежана Марковић испуњава Законом и одговарајућим Правилником Универзитета у Крагујевцу предвиђене услове да буде ментор предложене докторске дисертације.

6. Научна област докторске дисертације.

Предложена тема докторске дисертације припада научној области **Биологија**, а ужо научној области **Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија**.

7. Научна област чланова комисије.

Ментор и предложени чланови комисије се баве научним радом у областима релевантним за тему предложене докторске дисертације. Сви чланови комисије имају већи број радова објављених у међународним научним часописима и завидно искуство у образовању научног подмлатка у својим институцијама.

Др Татјана Љ. Митровић, редовни професор Универзитета у Нишу, Природно-математички факултет, ужа научна област: Експериментална биологија и биотехнологија. Тренутно је ангажована на 11 различитих предмета из области молекуларне биологије, биотехнологије и генетике на основним, мастер и докторским академским студијама Биологије на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу. Од 2001. године се бави научно-наставним радом на Департману за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Нишу. Пре тога се бавила научноистраживачким радом из области регулације транскрипције гена на Инстититуту за молекуларну генетику и генетичко инжињерство у Београду (1992-2000. година). Експериментални део докторске тезе из области молекуларне онкологије и генске терапије тумора урадила је током усавршавања у Француској (2000-2001. година). Тренутно је шеф Катедре за Експерименталну биологију и биотехнологију и шеф Лабораторије за молекуларну биологију и биотехнологију на Департману за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Нишу. Бави се молекуларном биологијом тумора на текућем научно-истраживачком пројекту.

Др Данијела В. Тодоровић, ванредни професор Универзитета у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, ужа научна област: Генетика. Тодоровић В. Данијела се бави научноистраживачким и наставним радом у области молекуларне биологије и хумане генетике. Посебан допринос дала је у изучавању молекуларних механизама малигнитета код људи. Фокус научноистраживачког рада је *in vitro* испитивање молекуларних механизама јонизујућег зрачења, хормона и биоактивних супстанци, а у последњих неколико година и форензичка генетика. У оквиру наставе ангажована је на 9 акредитованих предмета на свим нивоима студија. До сада је ментор две докторске дисертације и дипломског рада из научне области којом се бави.

Др Милош М. Матић, доцент Универзитета у Крагујевцу, Природно-математички факултет Ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија. Бави се научноистраживачким радом у доменима ћелијске и молекуларне физиологије, ћелијског сигналинга и кретања, ендокринологије и имунобиологије. На основним, мастер и докторским академским студијама Биологије и Екологије предаје више предмета из области анималне и хумане физиологије и патофизиологије.

Др Петар С. Арсенијевић, доцент Универзитета у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, ужа научна област: Гинекологија и акушерство. Доц др Петар Арсенијевић већ деценију активно учествује у настави предмету Гинекологија и акушерство на основним академским и стручовним студијама, као и на смеру Хумана репродукција и развој на докторским студијама Факултета медицинских наука. Део своје истраживачке активности усмерио је на испитивање гинеколошких малигнитета, пре свега на карцином грила материце, карцином ендометријума, као и карциноме оваријума.



8. Биографија кандидата са библиографијом.

Александра Г. Никезић је рођена 15.02.1994. године у Крагујевцу. Основну школу „21. октобар“ је завршила 2008. године у Крагујевцу. Средњу школу „Прва крагујевачка гимназија“ завршила је 2012. године. Исте године је уписала основне академске студије Биологије на Институту за биологију и еколоџију (ИБЕ), Природно-математичког факултета (ПМФ), Универзитета у Крагујевцу (УН КГ), које је завршила 2016. године са просечном оценом 9,33. Као студент истраживач, укључила се у проучавање цитотоксичних и прооксидационих/антиоксидационих ефеката активних супстанци из природних извора на ћелијским линијама карцинома колона и дојке. Мастер академске студије Биологија – молекуларна биологија је уписала 2016. године на ИБЕ, ПМФ, УН КГ. Током студентске мобилности у оквиру ERASMUS+ CREDIT MOBILITY програма, који је реализован у периоду од 14.02.2017. до 31.07.2017. године на Универзитету „Sapienza“ у Риму, на програму „Мастер молекуларне биологије и генетике“, похађала је и успешно положила више предмета предвиђених програмом (*Structure biosynthesis and analysis of proteins, Molecular and cellular physiology, Human genetics, Lingua italiana*). Завршни рад под насловом „Релативна експресија гена за апоптозу и биотрансформацију биоактивних супстанци у здравим и ћелијама карцинома дојке“, ментор доц. др Снежана Марковић, одбранила је са оценом 10 (29. септембра 2017. године) и стекла академско звање Мастер биолог-молекуларни биолог са укупном просечном оценом 9,89. Исте године је уписала прву годину Докторских академских студија Биологије, ужа научна област Физиологија човека и молекуларна биологија, на ИБЕ, ПМФ, УН КГ.

Свој научноистраживачки рад у оквиру докторске дисертације започела је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију (Лабораторија) ИБЕ, ПМФ, УН КГ. У звању истраживач-приправник (2018.-) ангажована је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије "Преклиничка испитивања биоактивних супстанци - ПИБАС" (Пројекат ИИИ41010 закључно са 2019.; по Уговору о реализацији и финансирању научноистраживачког рада НИО-ПМФ у 2020.-2021. години).

Током докторских академских студија, под менторством доц. др Снежане Марковић као изабраним наставником-саветником, Александра Никезић је едукована у ужој научној области Физиологија човека и молекуларна биологија. Положила је четири уско стручна предмета (Молекуларна биологија еукариотске ћелије, Молекуларна физиологија, Системска физиологија и Молекуларна биологија малигне ћелије). Кроз 6 студијско-истраживачких предмета (Истраживачки рад 1-4, Докторска дисертација-студијско истраживање 1, 2) дефинисала је оквире научноистраживачког рада.

У оквиру експерименталног дела научноистраживачког рада у Лабораторији, Александра Никезић је овладала савременим техникама и методама ћелијске и молекуларне биологије и укључила се у експериментална истраживања у области:

Ћелијска биологија:

- Правилно складиштење, култивација и манипулација имортализованим ћелијским линијама карцинома дојке и колона, примарним ћелијским линијама тумора јајника.
- In vitro* тестирање цитотоксичног ефекта биоактивних супстанци на имортализованим ћелијским линијама МТГ методом; Одређивање типа ћелијске смрти Акридин оранж-Етидијум бромид (АО-ЕБ) микроскопском методом на имортализованим ћелијским линијама.
- Биоинформатичка и статистичка обрада резултата тестирања цитотоксичних ефеката биоактивних супстанци.
- Анализа ефекта третмана на редокс статус ћелија карцинома одређивањем нивоа реактивних врста кисеоника NBT тестом и редукованог глутатиона GSH тестом.



- Анализа антимиграторног ефекта третмана на ћелијским линијама карцинома дојке *Scratch wound healing* методом и праћење инвазије у реалном времену The xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) системом.
- Испитивање протеинске експресије имуноцитофлуоресцентном микроскопијом на имортализованим ћелијским линијама.

Молекуларна биологија:

- Формирање биобанки генома, протеома и транскриптома изолованих из различитих типова узорака. Правилно складиштење и чување хуманих узорака уз заштиту поверљивости података пацијената. Израда научне студије за одобрење Етичког комитета.
- Изолација ДНК и РНК молекула из хуманих, биљних и животињских узорака. Реверзна транскрипција и превођење РНК молекула у комплементарну ДНК.
- Амплификација циљаних ДНК секвенци Multiplex PCR методом из хуманих, биљних и животињских узорака.
- Испитивање експресије информационих РНК молекула изолованих из туморског ткива, примарних и имортализованих ћелијских линија qPCR методом у реалном времену.
- Секвенирање циљаних ДНК секвенци методом по Сангеру и биоинформатичка обрада резултата секвенирања применом Chromas Lite и Megab софтвера у циљу дефинисања полиморфизма и одређивања хаплогрупа њиховом компарацијом са различitim геномским базама попут NCBI, Blast и MITOMASTER.

У оквиру Лабораторије савладала је методе рада, планирања и извођења експеримента, као и обраде и презентовања резултата истраживања.

Стручна и научна усавршавања:

- У фебруару 2018. године похађала је обуку за изолацију ДНК молекула из хуманих узорака букалне слузнице на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Реализатор обуке: др Јелена Ракобрадовић, научни сарадник са Института за онкологију и радиологију Србије.
- У септембру 2018. године је била полазник у III Петничкој школи молекуларне биологије „PCR у биолошким и биомедицинским истраживањима“ у Истраживачкој станици Петница код Ваљева.
- У фебруару 2019. године присуствовала је обуци за оптимизацију услова PCR амплификације на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Реализатор обуке: др Јелена Ракобрадовић, научни сарадник са Института за онкологију и радиологију Србије.
- У марта 2019. године присуствовала је дводневној обуци за секвенирање по Сангеру укупног ДНК узорка хуманог, биљног, животињског и микротешког порекла на Ветеринарском специјалистичком институту у Краљеву. Реализатор обуке др Дејан Видановић, научни саветник ВСИ.
- У јулу 2019. године била је на обуци за изоловање и култивацију примарних ћелијских култура глиобластома на Институту за биолошка испитивања „Синиша Станковић“ у Београду. Реализатор обуке др Милица Пешић, научни саветник ИБИСС.
- У октобру 2019. учествовала је у биоинформатичкој радионици у сарадњи компаније „Seven Bridges Genomics“ и Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу.

Поред научноистраживачког рада Александра Никезић је ангажована у реализацији вежби из предмета „Матичне ћелије и биотехнологија“. Учествовала је у експерименталном раду мастер студената Биологије-молекуларна биологија, који су у Лабораторији радили завршне радове из области Физиологије животиња и човека и молекуларне биологије. Активно је учествовала у промоцији науке и Природно-математичког факултета као представник Лабораторије, ИБЕ и ПМФ на различитим фестивалима попут „Ноћ истраживача“, „Ноћ музеја“, „Фестивал науке“ и еколошкој ТВ емисији „Стаклено звоно“.



Научноистраживачки рад у оквиру израде докторске дисертације, Александра Никезић ће реализовати у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, ИБЕ, ПМФ, УН КГ.

Библиографија

У току свог научноистраживачког рада, Александра Никезић је публиковала укупно 6 библиографских јединица: два рада у националном часопису међународног значаја (M24) и 4 саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (M34).

Радови објављени у научним часописима међународног значаја (M24):

1. Nikezić AG, Blagojević SZ, Ćupurdija MĐ, Planojević NS, Jovankić JV, Rakobradović JD, Vidanović DS, Arsenijević DD, Marković SD. Comparative analysis of human DNA extraction methods and mitochondrial DNA HV1 and HV2 haplogroup determination. *Kragujevac Journal of Science*, 2020, 42: 73-83, ISSN: 1450-9636; doi: 10.5937/KgJSci2042073N. **M24**
2. Blagojević SZ, Cvjetković VM, Nikezić AG, Milutinović MG, Marković SD. Bioinformatics online support for bioactive substances cytotoxicity testing and their statistical analysis. *Kragujevac Journal of Science*, 2020, 42: 55-72, ISSN: 1450-9636; doi: 10.5937/KgJSci2042055B. **M24**

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34):

1. Blagojević SZ, Furtula B, Nikezić AG, Milutinović MG, Živanović MN, Marković SD. Statistical clustering of IC₅₀ values as indicators of cytotoxicity of bioactive substances on HCT-116 and SW-480 cell line on colon cancer. 7th Conference of Serbian Biochemical Society "Biochemistry of Control in Life and Technology", Belgrade, Serbia. November 10. 2017, pp. 129. ISBN: 978-86-7220-091-1. **M34**
2. Nikezić A, Cvetković D, Jovankić J, Marković S. The influence of *Robinia pseudoacacia* L. and *Amorpha fruticosa* L. on relative expression of the genes for apoptosis and biotransformation in normal and breast carcinoma cells. FEBS3+ Conference "From Molecules to Living Systems", Siófok, Hungary. September 2-5. 2018, pp. 67. ISBN: 978-615-5270-47-5. **M34**
3. Nikezić A, Blagojević S, Planojević N, Ćupurdija M, Jovankić J, Cvetković D, Veličković T, Simić V, Marković SD. Comparative analysis of DNA extraction methods from human buccal swabs and fish tissue samples. 9th Conference of Serbian Biochemical Society "Diversity of Biochemistry". Belgrade, Serbia. November 14-16. 2019, pp. 140. ISBN: 978-86-7220-101-7. **M34**
4. Ćupurdija M, Planojević N, Blagojević S, Nikezić A, Jovankić J, Milutinović M, Lazović M, Grbović F, Marković SD. Comparative study of different DNA isolation methods from plants and fungus. 9th Conference of Serbian Biochemical Society "Diversity of Biochemistry", Belgrade, Serbia. November 14-16. 2019, pp. 83. ISBN: 978-86-7220-101-7. **M34**

ЗАКЉУЧАК КОМИСИЈЕ

Кандидат Александра Г. Никезић, истраживач приправник и мастер биолог-молекуларни биолог, студент је докторских академских студија биологије, ужа област Физиологија и молекуларна биологија, у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу. Одслушала је завршну годину студија и положила све планом и програмом предвиђене испите. Резултате истраживања је публиковала у 6 библиографских јединица: два рада у националном часопису међународног значаја (M24) и 4 саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (M34). Увидом у доступну документацију и чињенице, као и анализом литературних података о стању истраживања у области предложене Дисертације, Комисија закључује да је предложена тема за израду докторске дисертације заснована на савременим научним сазнањима, те да ће реализација истраживања у оквиру ове теме представљати значајан допринос развоју области ћелијске и молекуларне биологије тумора јајника хумане популације.



Сматрајући да постоје сви релевантни предуслови да се предложена истраживања квалитетно реализују, уз поштовање принципа професионалне и научне етике, посебно у погледу коришћења хуманог материјала, Комисија потврђује да је тема докторске дисертације „**Епигенетичка регулација експресије гена укључених у малигну трансформацију и инвазију тумора јајника**“ актуелна и научно заснована, а кандидат дисертације, у складу са Законом и одговарајућим Правилником Универзитета.

За **ментора** дисертације, Комисија предлаже доц. др **Снежану Марковић**, Природно-математички факултет Универзитета у Крагујевцу.

У Крагујевцу,
05.05.2021. године

КОМИСИЈА

Татјана Ј. Митровић

Др Татјана Ј. Митровић, редовни професор; **председник Комисије**
Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет
Ужа научна област: Експериментална биологија и биотехнологија.

С. Марковић

Др Снежана Д. Марковић, доцент; **предложени ментор**
Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
Ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија.

Данијела В. Тодоровић

Др Данијела В. Тодоровић, ванредни професор; **члан Комисије**
Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука
Ужа научна област: Генетика.

Милош Матић

Др Милош М. Матић, доцент; **члан Комисије**
Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
Ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија.

Петар С. Арсенијевић

Др Петар С. Арсенијевић, доцент; **члан Комисије**
Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука
Ужа научна област: Гинекологија и акушерство.



Veću katedre Instituta za biologiju i ekologiju (IBE)

Predmet: Mišljenje rukovodioca doktorskih akademskih studija biologije (DASB), na Izveštaj komisije o oceni naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata Aleksandre Nikezić, istraživač pripravnik, studenta Doktorskih akademskih studija biologije na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Kragujevcu, za izradu doktorske disertacije pod naslovom: „**Epigenetička regulacija ekspresije gena uključenih u malignu transformaciju i invaziju tumora jajnika**“

Na osnovu uvida u pisani materijal Izveštaja komisije o oceni naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata Aleksandre Nikezić, za izradu doktorske disertacije pod naslovom: „**Epigenetička regulacija ekspresije gena uključenih u malignu transformaciju i invaziju tumora jajnika**“ - dajem pozitivno mišljenje na sadržaj Izveštaja kao i na predlog mentora.

Rukovodilac DASB


Prof. dr Vladica Simić

U Kragujevcu

10. 05. 2021.g.