

Биолошки факултет
Број захтева: 33/140-1
Датум: 12.6.2015.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ: **Сања В. Срзентић**

студент докторских студија на студијском програму Молекуларна биологија, Молекуларна биологија еукариота.

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Молекуларни основа Лег-Калве-Пертесове болести: молекуларни маркери поремећаја коагулације, инфламације, апоптозе, формирања и ремоделовања коштаног ткива“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 27.11.2014. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-5346/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Молекуларни маркери поремећаја коагулације, инфламације, апоптозе, формирања и ремоделовања коштаног ткива код Лег-Калве-Пертесове болести“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 17.04.2015. год, одлуком Факултета под бр. 33/79-17.04.2015. год. у саставу:

| | Име и презиме члана комисије | звање | научна област | Установа у којој је запослен |
|-------|---------------------------------|-------------------------|---|---|
| 1. | др Гордана Никчевић | виши научни сарадник | молекуларна биологија | Универзитет у Београду- Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство |
| 2. | др Соња Павловић | научни саветник | молекуларна биологија | Универзитет у Београду- Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство |
| 3. | др Душанка Савић- Павићевић | ванредни професор | биохемија и молекуларна биологија | Универзитет у Београду- Биолошки факултет |
| <hr/> | | | | |
| <hr/> | | | | |
| <hr/> | | | | |

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

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 12. јуна 2015. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Прилог: 1. Реферат комисије са предлогом.

2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању реферата

3. Примедбе дате у току стављања реферата на увид у јавности, уколико је таквих примедби било.

4. Електронска верзија.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

33/140-12.6.2015.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на VIII редовној седници одржаној 12.6.2015. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Сање Срзентић, под називом:

„Молекуларни маркери поремећаја коагулације, инфламације, апоптозе, формирања и ремоделовања коштаног ткива код Лег-Калве-Пертесове болести“.

Универзитет је дана 27.11.2014. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-5346/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

Srzić S, Nikčević G, Spasovski D, Baščarević Z, Živković Z, Terzić-Šupić Z, Matanović D, Djordjević V, Pavlović S, Spasovski V. *Predictive genetic markers of coagulation, inflammation and apoptosis in Perthes disease-Serbian experience*. Eur J Pediatr; 2015, DOI 10.1007/s00431-015-2510-z **M21**

Srzentic S, Spasovski V, Spasovski D, Zivkovic Z, Matanovic D, Bascarevic Z, Terzic Supic Z, Stojiljkovic M, Karan-Djurasevic T, Stankovic B, Pavlovic S, Nikcevic G, Vukašinović Z. *Association of gene variants in TLR4 and IL-6 genes with Perthes disease*. Srp Arh Celok Lek; 2014, 142(7-8):450-6. **M23**

Декан Биолошког факултета

Доставити:

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

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

НАСТАВНО – НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VI редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 17.04.2015. године, прихваћен је извештај ментора др Гордане Никчевић и др Соње Павловић о урађеној докторској дисертацији Сање В. Срзентић, под насловом: „Молекуларни маркери поремећаја коагулације, инфламације, апоптозе, формирања и ремоделовања коштаног ткива код Лег-Калве-Пертесове болести“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Гордана Никчевић, виши научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, др Соња Павловић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду и др Душанка Савић Павићевић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Сање Срзентић је оригинално истраживање које за тему има молекуларне маркере патофизиологије ортопедско педијатријског обољења, Лег-Калве-Пертесове (ЛКП) болести. ЛКП болест је идиопатска аваскуларна остеонекроза епифизе фемура код деце, за коју се сматра да је мултифакторијално обољење, на чији развој утичу средински и генетички фактори. Међутим, етиологија и патофизиологија ове болести су нејасне и после више од једног века од како је описана. Једини терапијски третман ЛКП болести је хируршки, али овај приступ не доводи до потпуног излечења. У последње време се као потенцијални терапијски приступ за лечење аваскуларних остеонекроза испитује употреба мезенхимских матичних ћелија (ММЋ). Истраживања у оквиру

ове докторске дисертације бавила су се идентификацијом генетичких и молекуларних маркера који би могли да имају значај у разумевању молекуларне патофизиологије, предикцији за настанак, као и побољшању терапије ЛКП болести. Такође, део тезе је био посвећен истраживањима која се односе на повећање терапијског капацитета ММЋ.

Докторска дисертација Сање Срзентић је урађена у Лабораторији за молекуларну биомедицину на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

Докторска дисертација је подељена на 7 поглавља: Увод, Циљеви, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Осим тога, садржи и Резиме (на српском и енглеском језику). Дисертација је написана на 136 страна и садржи 17 слика, 17 табела и 202 наслова у поглављу Литература који се адекватно наводе у тексту.

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Предмет докторске дисертације је идентификација молекуларних и генетичких маркера ЛКП болести. Анализиране су варијанте у генима чији протеински производи учествују у регулацији процеса коагулације и имунског одговора. Поред тога, анализирана је експресија гена који учествују у процесу инфламације и апоптозе. Један део истраживања је био фокусиран на терапеутски капацитет ММЋ.

Поглавље УВОД садржи савремена сазнања везана за научну област која је била предмет истраживања. У овом делу је дат садржајан преглед литературних података који се односе на ЛКП болест. Истакнуто је да се о етиологији и генетичким факторима који доприносе развоју ове болести за сада врло мало зна. Наведено је да би поремећаји процеса коагулације, инфламације и апоптозе могли утицати на развој ЛКП болести, као и на патолошки процес ремоделовања и

формирања коштаног ткива до кога долази током патогенезе ове болести. Описане су функције и варијанте гена који учествују у наведеним процесима а који су испитивани у раду. Поред тога, истакнут је значај развоја нових терапијских приступа за лечење ЛКП болести, у оквиру чега су наведене особине које чине ММЋ погодним за употребу у ћелијској и генској терапији болести скелетног система. Описани су досадашњи резултати добијени на основу клиничких испитивања употребе наивних и генетички модификованих ММЋ у терапији различитих болести. Приказана сазнања истичу значај и актуелност истраживања улоге испитиваних генетичких и молекуларних маркера ЛКП болести и нових терапијских приступа у њеном лечењу.

Поглавље ЦИЉЕВИ садржи пет јасно дефинисаних циљева овог истраживања. Као први циљ наведено је испитивање асоцијације генских варијанти коагулационих фактора: *FV* G1691A (Леиден мутација), *FII* G20210A, *MTHFR* C677T и *PAI-1* 4G/5G са појавом ЛКП болести код пацијената из Србије. Други циљ је био анализа асоцијације генских варијанти маркера инфламације: *IL-6* [G-174C, G-597A]; *IL-3* [C-16T, C132T]; *TNF-α* G-308A (rs1800629) и *TLR4* [Asp299Gly, Thr399Ile] са појавом ЛКП болести. Као трећи циљ је наведена анализа нивоа експресије маркера инфламације *IL-6* и *TNF-α* код ЛКП пацијената. Четврти циљ је била анализа нивоа експресије маркера унутрашњег (*Bax*, *Bcl-2* и *Bcl2L12*) и спољашњег (*Fas* и *FasL*) апоптотског пута код ЛКП пацијената. Пети циљ је био изоловање, гајење и транзијентна трансфекција ММЋ из адипозног ткива пса.

У оквиру поглавља МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ описана је група испитаника коју су чинили пацијенти којима је дијагностикована ЛКП болест, као и контролне групе које су чинили здрави испитаници. Узорци су прикупљени у сарадњи са Институтом за хируршко ортопедске болести „Бањица” у Београду. Детаљно су описане све примењене експерименталне процедуре. За детекцију генетичких варијанти коришћене су PCR-RFLP метода и метода директног секвенцирања PCR фрагмента. За мерење нивоа експресије гена коришћена је qRT-PCR метода. Такође, описани су методолошки приступи коришћени за изоловање, гајење и

транзијентну трансфекцију ММЋ. За статистичку обраду података су коришћени непараметријски статистички тестови – Хи-квадрат тест независности, Фишеров егзактни тест и Ман-Витнијев тест (тест суме рангова). Вредности гаметске неравнотеже везаности међу генским варијантама (енг. *linkage disequilibrium*), су добијене коришћењем *Haploview* програма.

У поглављу РЕЗУЛТАТИ кандидаткиња је изложила резултате добијене наведеним истраживањима. Први део овог поглавља се односи на анализу асоцијације генских варијанти коагулационих фактора и маркера инфламације са појавом ЛКП болести. Поређењем учесталости генотипова и алела генских варијанти коагулационих фактора, између групе пацијената и контролне групе, није пронађена статистички значајна разлика. Када су у питању генске варијанте маркера инфламације, утврђено је да су носиоци хетерозиготног генотипа *IL-6* - 174GC/-597GA били значајно мање заступљени у групи пацијената у односу на контролну групу и да је ризик за настанак ЛКП болести мањи код носилаца наведеног генотипа. У складу са овим, група ЛКП пацијената није била у Харди-Вајнберговој равнотежи за анализирану варијанту *IL-6* гена. Са друге стране, поређењем учесталости генотипова и алела у групи пацијената са контролном групом није показана статистички значајна разлика за *IL-3*, *TNF- α* и *TLR4* анализираних генских варијанте.

Други део поглавља РЕЗУЛТАТИ се односи на испитивање нивоа експресије гена који учествују у процесу инфламације и апоптозе код ЛКП пацијената. Није пронађена статистички значајна разлика нивоа експресије ни *IL-6* нити *TNF- α* гена при поређењу групе пацијената са контролном групом. Такође, у овој студији није детектована значајна разлика у нивоима експресије гена спољашњег апоптотског пута, *Fas* и *FasL*, као ни односа нивоа експресије ова два гена, између групе пацијената и контролне групе.

Међутим, резултати овог дела истраживања су указали на значај унутрашњег апоптотског пута у патофизиологији ЛКП болести. Показан је значајно повишен ниво експресије проапоптотског фактора *Bax*. Што је још

битније, однос нивоа експресије *Bax / Bcl-2* гена је био значајно повишен у групи пацијената.

Трећи део поглавља РЕЗУЛТАТИ се односи на изолацију, диференцијацију и трансфекцију ММЋ. ММЋ су успешно изоловане из адипозног ткива пса и показан је њихов потенцијал за диференцијацију индукцијом ка остеогеној и хондрогеној ћелијској линији. Поред тога, успостављени су услови за успешну транзијентну трансфекцију ММЋ коришћењем два регенса чија дејства се заснивају на различитим механизмима. Применом оптимизованих услова, показана је успешна експресија хуманог антиинфламаторног цитокина *IL-10* са плазмидног вектора трансфекваног у ММЋ пса.

У поглављу ДИСКУСИЈА се коментаришу резултати приказани у овој тези и пореде са подацима из литературе чији су аутори водећи истраживачи у овој области. У првом делу дискусије изнета су сазнања из литературе добијена из студија које су се бавиле асоцијацијом поремећаја коагулације и ЛКП болести. Наведени подаци су упоређени са резултатима добијеним у овој докторској дисертацији. У другом делу је дискутована улога маркера инфламације, посебно *IL-6* у развоју ЛКП болести. Трећи део дискусије је био фокусиран на резултате добијене анализом експресије апоптотских гена код ЛКП пацијената. Процес апоптозе до сада није испитиван у ЛКП болести, а резултати добијени у овом раду указују да поремећај апоптозе може допринети неравнотежи процеса ремоделовања коштаног ткива код ЛКП пацијената. С обзиром на то, истакнуто је да би апоптотски фактори могли постати маркери за процену статуса и прогнозе ове болести, као и потенцијалне мете за циљану терапију.

У четвртом делу дискусије су разматрани резултати који се односе на успостављање услова за транзијентну трансфекцију ММЋ, са освртом на литерарне податке о значају коришћења наведеног приступа за побољшање терапеутског капацитета ових ћелија. Оптимизовањем транзијентне трансфекције су остварени услови за даља истраживања везана за побољшање ћелијске терапије и циљане доставе различитих биолошких агенаса на оболела места употребом ММЋ.

У поглављу ЗАКЉУЧЦИ су истакнути најзначајнији резултати и сазнања добијена истраживањем у оквиру докторске дисертације. Јасно је изнето 9 закључака који у потпуности произилазе из добијених резултата.

БИБЛИОГРАФИЈА

Сања Срзентић је публиковала 5 научних радова у часописима са СЦИ листе и учествовала са 17 саопштења на међународним научним скуповима и 1 саопштењем на скупу националног значаја, што укупно чини 23 библиографске јединице. Два публикована рада и 3 саопштења су из уже научне области дисертације, од чега су оба рада у часописима са СЦИ листе.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја М21

- **Srzentić S**, Nikčević G, Spasovski D, Baščarević Z, Živković Z, Terzić-Šupić Z, Matanović D, Djordjević V, Pavlović S, Spasovski V. *Predictive genetic markers of coagulation, inflammation and apoptosis in Perthes disease-Serbian experience*. Eur J Pediatr; 2015, DOI 10.1007/s00431-015-2510-z

Б1. Радови у часописима међународног значаја М23

- **Srzentic S**, Spasovski V, Spasovski D, Zivkovic Z, Matanovic D, Bascarevic Z, Terzic Supic Z, Stojiljkovic M, Karan-Djurasevic T, Stankovic B, Pavlovic S, Nikcevic G, Vukašinović Z. *Association of gene variants in TLR4 and IL-6 genes with Perthes disease*. Srp Arh Celok Lek; 2014, 142(7-8):450-6.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја М34

- **Srzentic S**, V Spasovski, D Spasovski, Z Zivkovic, D Matanovic, Z Bascarevic, Z Terzic Supic, M Stojiljkovic, T Karan-Djurasevic, B Stankovic, S Pavlovic, G

- Nikcevic, Z Vukasinovic. *Influence of gene variants and expression level of inflammatory mediators on occurrence of Perthes disease*. 2014 Golden Helix Summer School- "Pharmacogenomics and Genomic Medicine - Bridging research and the clinic", 11-15 September, 2014, Aegina Island, Greece. Abstract book: p105-106.
- **Srzentic S**, Spasovski V, Spasovski D2, Zivkovic Z, Matanovic D, Bascarevic Z, Terzic Supic Z, Stojiljkovic M, Karan-Djurasevic T, Stankovic B, Pavlovic S, Nikcevic G, Vukasinovic Z. *Association of gene variants in TLR4, TNF- α , IL-3 and IL-6 genes with Perthes disease*. ESHG 2014, Milan, Italy.
 - **Srzentic S**, Spasovski V, Spasovski D, Zivkovic Z, Matanovic D, Bascarevic Z, Terzic Supic Z, Stojiljkovic M, Karan-Djurasevic T, Stankovic B, Pavlovic S, Nikcevic G, Vukasinovic Z. *Association of gene variants in TLR4, TNF- α and IL-6 genes with Perthes disease*. AABC, 10-12 October, 2013, Bled, Slovenia, Abstract book: p127

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу изложеног у овом извештају сматрамо да докторска дисертација кандидаткиње Сање Срзентић представља оригиналан и значајан научни допринос разумевању молекуларне основе и патофизиологије ЛКП болести. Такође, добијени резултати указују на потенцијалну употребу испитиваних молекуларних маркера у предикцији настанка ове болести, постављању дијагнозе, као и развоју нових терапијских приступа за њено лечење. Најзначајнији допринос ове тезе су резултати који се односе на инфламаторне и апоптотске факторе који до сада нису анализирани у ЛКП болести.

У изради дисертације, кандидаткиња Сања Срзентић је показала изузетан степен самосталности у постављању хипотеза и циљева, одабиру адекватних метода и њиховом модификовању према циљевима истраживања, као и обради

добијених података. Резултате добијене у овом истраживању је критички дискутовала у односу на исцрпне податке из литературе и показала одлично познавање основне научне проблематике.

На основу свега наведеног, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Сање Срзентић под насловом: “Молекуларни маркери поремећаја коагулације, инфламације, апоптозе, формирања и ремоделовања коштаног ткива код Лег-Калве-Пертесове болести”.

Београд, 11. 05. 2015.

Комисија:

др Гордана Никчевић, виши научни сарадник
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
Универзитет у Београду

Др Соња Павловић, научни саветник
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
Универзитет у Београду

Др Душанка Савић Павићевић, ванредни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду