

Институт сатјасан
26. 06. 2017. год.
М. Сеанковић

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ПРИМЉЕНО: 26.06.2017.			
Орг. јад.	Број	ПРИЛОГ/БРЕДНОСТ	
04	470/12	-	-

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКОГ ФАКУЛТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ И
ВЕЋУ ЗА ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКЕ НАУКЕ
УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ**

Веће за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу, на основу члана 48. Статута универзитета у Крагујевцу (број II-01-360 од 28.04.2017. године -- пречишћен текст), члана 14. правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације, докторског уметничког пројекта (број ПТ-01-749/21 од 29.09.2016. године), Одлуке о изменама и допунама Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације, докторског уметничког пројекта (број 111-01-43/10 од 26.01.2017. године), чланова 42. и 43. став 1. Пословника о раду Већа Универзитета у Крагујевцу (број III-01-188 од 07.03.2016. године — пречишћен текст), а имајући у виду предлог Наставно-научног већа Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Одлука број 280/XIII-I од 12.04.2017. године, на седници одржаној 10.05.2017. године, одлуком број IV-01-478/8 именована је комисија за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом „Улога молекуларних механизма неоангиогенезе као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке“ кандидата Данијеле М. Цветковић, дипломираног биолога, у следећем саставу:

- 1 **Др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор,** председник Комисије Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
ужа област: Генетика и еволуција;
- 2 **Др Милена Милутиновић, научни сарадник**
Природно-математичког факултета, Универзитет у Крагујевцу
научна област: Биологија
- 3 **Др Ненад Филиповић, редовни професор**
Факултет инжењерских наука, Универзитет у Крагујевцу
ужа научна област: Примењена механика и примењена информатика и рачунарско инжењерство;
- 4 **Др Срђан Нинковић, доцент**
Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
ужа научна област: Хирургија;
- 5 **Др Ивана Гађански, доцент**
BioSense Институт, Универзитет у Новом Саду,
Метрополитан универзитет, Београд.
Ужа научна област: Ткивно инжењерство;

На основу предложене документације и рукописа, сагласно члану 58. став 3 Статута Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Комисија подноси Наставно-научном већу Природно-математичког факултета следећи:

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Данијела М. Цветковић**, дипломирани биолог је сагласно Правилнику о пријави, изради и одбрани докторске дисертације Универзитета у Крагујевцу, одлуци број 740/XVI-2 Наставно-научног већа Природно-математичког факултета у Крагујевцу од 26.08.2015. године и одлуци број IV-01-485/10 Већа за Природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу од 09.09.2015. године поднела рукопис докторске дисертације под насловом: **Улога молекуларних механизма неоангиогенезе као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке.**

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

Предмет истраживања докторске дисертације кандидата Данијеле М. Цветковић, под насловом “Улога молекуларних механизма неоангиогенезе као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке” представља (а) анализу молекуларних параметара неоангиогенезе у туморском и перитуморском ткиву пацијената са карциномом дојке, (б) *in vitro* испитивања нових видова терапије (електропорација, електрохемиотерапија и испитивања биоактивних супстанци из биљака) на имортализованим ћелијским линијама карцинома дојки, праћењем цитотоксичних ефеката и сигналних путева неоангиогенезе, (в) развој софтверског пакета за обраду података и предикцију исхода болести. Сва три аспекта истраживања докторске дисертације имају за резултат значајан помак на пољу индивидуализације терапије карцинома дојке. Докторска дисертација заснована је на интердисциплинарном приступу третману канцера дојки у ком сарађују бројне специјалности, почев од лекара, преко ћелијских и молекуларних биолога, до инжењера примењене информатике. Карцином дојке је најчешће дијагностикован малигни тумор. Водећи је узрок смрти од карцинома код жена широм света, што чини 23% од укупног броја дијагностикованих карцинома. У Србији 26% свих оболелих и 18% свих умрлих жена због малигнух тумора имају дијагнозу карцинома дојке (Регистар за рак централне Србије 1999-2009). Стандардни видови терапије карцинома дојке подразумевају хируршки третман, радиотерапију и хемиотерапију (адјувантна и неоадјувантна), хормонску и биолошку терапију. Упркос оствареном напретку у дијагностици и лечењу, очигледан је висок морбидитет и морталитет од карцинома дојке тако да су неопходни нови приступи у лечењу ове болести.

Тежиште истраживања дисертације је посвећено изучавању неоангиогенезе као једног од најзначајнијих патофизиолошких процеса у настанку, развоју и дисеминацији малигне болести. Хипотеза докторске дисертације се заснива на чињеници да су данашњи онколошки протоколи превише крути и апроксимативни и донекле занемарују особености пацијента и биологију тумора сваког пацијента. Сходно томе, циљ коме тежи модерна онкологија је индивидуализација терапије, што је и основна премиса ове дисертације. У том циљу су праћени молекуларни параметри неоангиогенезе у ткиву канцера дојки, као један од механизма који је круцијалан у процесу појаве и развоја тумора.

Осим тога, конвенционални видови онколошке терапије имају бројна и тешка нежељена дејства, те је у оквиру дисертације посвећена пажња новим модалитетима антитуморске терапије, који могу имати подједнаку ефикасност, а знатно мање нежељених дејстава, као што су електропорација, електрохемиотерапија и примена фитотерапије. Електропорација предстаља процес повећања пермеабилности ћелијске мембране применом електричног поља. Привременим отварањем пора на ћелијској мембрани се постиже повећан унос хемиотерапијског средства у туморско ткиво и овај начин примене електропорације се назива електрохемиотерапија.

Следећи сегмент истраживања у оквиру докторске дисертације је био развој софтверског пакета који служи за обраду података, предикцију исхода болести и у стању је да сугестије у лечењу. Сви добијени подаци, анамнестички, клинички, imaging, патохистолошки и молекуларни (параметри генске и протеинске експресије) представљали су улазне параметре које обрађује data mining софтвер, и може да изврши предикцију понашања тумора у смислу рецидива тумора и метастазирања, што директно утиче на избор одговарајућег терапијског модалитета. Излазни параметри овог софтвера су: 5-огодишње преживљавање, рецидив болести и појава метастаза. На тај начин може се формирати биолошки профил тумора, који омогућава спровођење индивидуализоване терапије.

У оквиру дисертације, интердисциплинарним приступом је на модеран и свеобухватан начин изучавана веома актуелна тема, а добијени одговори омогућавају:

- креирање биолошког профила тумора за сваког појединачног пацијента што представља индивидуализацију терапије;
- боље разумевање биологије малигну болести, кроз фундаментална изучавања на нивоу малигне ћелије;
- одређивање осетљивости малигне ћелије на одређене типове терапије; формирање нових и побољшавање постојећих онколошких протокола, као и откривање нових могућности и модалитета лечења пацијената са малигну туморима (електропорација и фитотерапија);
- креирање софтвера за аутоматизовану обраду података, који је у стању да формира биолошки профил тумора сваког појединачног пацијента, са параметрима предикције и сугестијама у даљем лечењу.

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

Имајући у виду доступне литературне податке из области поднетог рукописа докторске дисертације, као и предмет, хипотезе, образложени циљ и резултате истраживања, Комисија је утврдила да је докторска дисертација под насловом: „Улога молекуларних механизма неоангиогенезе као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке“ резултат оригиналног научног рада кандидата.

Резултати ове докторске дисертације су показали да карцином изазива промене у туморском и перитуморском ткиву детектабилне на молекуларном нивоу, које нису евидентирани на патохистолошком налазу. Није довољна само детаљна анализа туморског, већ обавезно и перитуморског ткива, јер се често значајније промене на молекуларном нивоу дешавају у микроокружењу карцинома. Перитуморско ткиво није само пасиван чинилац, већ активно учествује у процесу раста и развоја тумора, као и у процесима рецидивирања и појаве метастаза.

Маркери неоангиогенезе у туморском и перитуморском ткиву као што су концентрација MMP-9, експресија иРНК *VEGF-A*, *CXCL-12*, *HIF-1* и *iNOS* гена као и протеинска експресија VEGF и CXCR-4 рецептора, могу послужити као поуздани предиктори исхода болести код пацијената са карциномом дојке, што може дати корисне сугестије у избору третмана.

Електропорација и електрохемиотерапија су на изучаваним ћелијским линијама дале обећавајуће резултате, нарочито у компарацији ефеката између карциномских и здравих ћелија, што као резултат дисертације доприноси томе да ове методе полако улазе у клиничку праксу, али су додатна испитивања неопходна.

Екстракти листова инвазивних врста биљака *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* су показали антиинвазивно дејство на ћелијској линији карцинома дојке.

Data-mining техника обраде података заснована на компјутерским експертским системима вештачке интелигенције може обрадити претходно наведене изучаване параметре, тако да кориснички оријентисан софтвер изврши веома тачну предикцију исхода болести у смислу појаве рецидива тумора и метастаза, што је веома корисно за лекаре при доношењу одлуке о даљим модалитетима лечења.

3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

Библиографски подаци кандидата Данијеле М. Цветковић (девојачко Ђуричић)

Кандидат Данијела М. Цветковић, истраживач-сарадник и студент докторских академских студија Биологије у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија, тема докторске дисертације је прихваћена од стране надлежних Већа Универзитета, те тиме испуњава све формалне услове да приступи процедури одбране докторске дисертације.

Резултати научно-истраживачког рада кандидата Данијеле М. Цветковић објављени су у оквиру **31 библиографске јединице**, од чега **12 радова у међународним научним часописима** (у врхунским M21–3 рада, водећим M22–1 рад, међународним M23–8 радова), 3 рада објављена у научним часописима националног значаја (M52-3 рада), 9 саопштења на међународним научним скуповима (штампана у целини M33–2, и штампана у изводу M34-7), 7 саопштења на националним научним скуповима (M64–7).

A. Научни радови објављени у научним часописима међународног значаја (SCI, M20):

Врхунски међународни часописи - M21 (8 бодова)

1. **Cvetković DM**, Živanović MN, Milutinović MG, Djukić TR, Radović MD, Cvetković AM, Filipović ND, Zdravković ND. Real-time monitoring of cytotoxic effects of electroporation on breast and colon cancer cell lines. *Bioelectrochemistry* 2017; 113: 85-94. ISSN: 1567-5394. IF₂₀₁₆ 3.346. **M21**
2. Cvetkovic AM, **Cvetkovic DM**, Stojic VV, Zdravkovic ND. Length of hospital stay and bed occupancy rates in former Yugoslav Republics 1989 – 2015. *Frontiers in Pharmacology* 2016; 7: 417. ISSN 1663-9812. IF₂₀₁₆ 4.400. **M21**
3. Ćurčić MG, Stanković MS, Mrkalić EM, Matović ZD, Banković DD, **Cvetković DM**, Đačić DS, Marković SD. Antiproliferative and proapoptotic activities of methanolic extracts from *Ligustrum vulgare* L. as an individual treatment and in combination with palladium complex. *International Journal of Molecular Sciences* 2012; 13: 2521-2534. ISSN:1661-6596. IF₂₀₁₁ 2.598, IF₂₀₁₂ 2.464. **M21**

Истакнути међународни часописи - M22 (5 бодова)

4. Filipovic ND, Djukic TR, Radovic MD, **Cvetkovic DM**, Curcic MG, Markovic SD, Peulic AS, Jeremic BM. Electromagnetic field investigation on different cancer cell lines. *Cancer Cell International* 2014; 14: 84. ISSN: 1475-2867. IF₂₀₁₄ 2.766. **M22**

Међународни часописи -M23 (3 бода)

5. Milutinovic MG, Stanković MS, **Cvetković DM**, Maksimović V, Šmit B, Pavlović R, Marković S. The molecular mechanisms of apoptosis induced by *Allium flavum* L. and synergistic effects with newly synthesized Pd(II) complex on colon cancer cells. *Journal of Food Biochemistry* 2015; 39(3): 238-250. ISSN: 0145-8884. IF₂₀₁₅ 0.832. **M23**
6. Milutinović MG, Stanković MS, **Cvetković DM**, Šeklić DS, Topuzović MD, Mihailović VB, Marković SD. Antioxidant and Anticancer Properties of Leaves and Seed Cones from European Yew (*Taxus baccata* L.) *Archives of Biological Sciences* 2015; 67(2): 525-534. ISSN: 0354-4664. IF₂₀₁₅ 0.367. **M23**
7. Ćurčić MG, Stanković MS, **Cvetković DM**, Topuzović MD, Marković SD. *Ligustrum vulgare* l.: *in vitro* free radical scavenging activity and prooxidant properties in human colon cancer cell lines. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2014; 9(4): 1689-1697. ISSN: 1842-3582. IF₂₀₁₄ 0.945. **M23**
8. Kosaric JV, Zivanovic MN, **Cvetkovic DM**, Curcic MG, Seklic DS, Bugarcic ZM, Marković SD. Antioxidative and antiproliferative evaluation of 2-(phenylselenomethyl) tetrahydrofuran and 2(phenylselenomethyl)tetrahydropyran. *Journal of BUON / Journal of the Balkan Oncology* 2014; 19(1): 283-290. ISSN: 1107-0625. IF₂₀₁₄ 0.741. **M23**
9. Stolic RS, Mijailovic MZ, Cvetkovic AM, Stanojevic MS, Stolic DZ, **Cvekovic DM**: Distal ischemia induced by vascular access for hemodialysis - a case report. *Hippokratia* 2012; 16(4): 375-377. ISSN: 1108-4189 IF₂₀₁₂ 0.589. **M23**
10. Ninkovic SM, Ninkovic VM, Cvetkovic AM, **Cvetkovic DM**, Nedovic JR, Milosevic BZ. Multifocal and multicentric breast cancer: is breast conserving surgery acceptable? *Journal of BUON / Journal of the Balkan Oncology* 2012; 17: 38-45. ISSN: 1107-0625. IF₂₀₁₂ 0,761. **M23**
11. Marković SD, Žižić JB, Djačić DS, Obradović AD, Ćurčić MG, **Cvetković DM**, Đorđević NZ, Ognjanović BŠ, Štajn ŠA. Alteration of oxidative stress parameters in red blood cells of rats after

chronic *in vivo* treatment with cisplatin and selenium. *Archives of Biological Sciences* 2011; 63(4): 991-999. ISSN: 0354-4664. IF₂₀₁₁ 0.360. **M23**

12. Marković SD, Đačić DS, **Cvetković DM**, Obradović AD, Žižić JB, Ognjanović BI, Štajn AŠ. Effects of acute *in vivo* cisplatin and selenium treatment on hematological and oxidative stress parameters in red blood cells of rats. *Biological Trace Element Research* 2011; 142(3): 660-670. ISSN: 0163-4984. IF₂₀₁₁ 1.923. **M23**

Радови на рецензији:

Cvetkovic DM, Andjelkovic-Cirkovic BR, Ninkovic SM, Cvetkovic AM, Milosevic BZ, Filipovic ND. Intelligent system for estimation of survival rate, relapse and metastasis - a role in individualization of breast cancer therapy. *BMC Medical Informatics and Decision Making*. (Paper Accepted). ISSN: 1472-6947. IF₂₀₁₅ 2.042. **M22**

Cvetković DM, Milošević BZ, Cvetković AM, Ninković SM, Jovankić JV, Dalibor V Jovanovic DV, Marković SD. The concentration of matrix metalloproteinase 9 in the tumor and peritumoral tissue as prognostic marker in breast cancer patients. *Vojnosanitetski Pregled* ISSN: 0042-8450. IF₂₀₁₆ 0.367. **M23 (Under Review)**

Б. Научни радови објављени у научним часописима националног значаја (M50):

13. Nikodijević DD, Milutinović MG, **Cvetković DM**, Stanković MS, Živanović MN, Marković SD. Effects of *Teucrium polium* L. and *Teucrium montanum* L. extracts on mechanisms of apoptosis in breast and colon cancer cells. *Kragujevac Journal of Science* 2016; (38): 147-159. ISSN: 1450-9636. **M52**

14. Marković SD, Đačić DS, **Cvetković DM**, Obradović AD, Žižić JB, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Saičić ZS, Spasić MB. Effects of acute treatment of vitamin C on redox and antioxidative metabolism in plasma and red blood cells of rats. *Kragujevac Journal of Science* 2010; 32: 109-116. ISSN: 1450-9636. **M53**

15. Cvetković AM, Spasić MM, Pavlović MD, **Cvetković D**, Stojanović D, Ninković SM, Jevdjić JD, Čanović DS and Milošević BZ. The use of proton pump inhibitors in intensive care units. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. doi10.1515/sjecr-2017-0011. ISSN: 1820-8665 (*In press*). **M52**

В. Саопштења на научним конференцијама међународног значаја (M30)

Саопштења штампана у целини (M33)

16. Filipovic ND, Djukic TR, Radovic MD, **Cvetkovic DM**, Markovic SD, Jeremic BM. Experimental and numerical investigation of electromagnetic field at different cancer cell lines. 2013 *IEEE 13TH International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE)*, M.2.2.4: 85-86, 2013. ISBN: 978-1-4799-3162-0. **M33**

17. Đukić TR, **Cvetković DC**, Radović MD, Živanović MN, Filipović ND. Numerical modeling of behavior of cancer cells after electroporation. *IEEE International Conference on Bioinformatics & Bioengineering (BIBE)*. 2015; p.-57, Belgrade, Serbia. ISBN 978-1-4673-7983-0. **M33**

Саопштења штампана у изводима (M34)

18. Jovankić JV, **Cvetković DM**, Milutinović MG, Nikodijević DD, Živanović MN, Grbović FJ, Marković MD. Molecular mechanisms of redox status and antitumor activity of extracts of invasive plant species (*Robinia pseudoacacia* and *Amorpha fruticosa*) in MRC-5 and MDA-MB-231 cell lines. Serbian Biochemical Society Sixth Conference "Biochemistry and Interdisciplinarity: Transcending the Limits of field". November 18, 2016, Belgrade; 123-125. ISBN: 978-86-7220-081-2. **M34**
19. **Cvetković DM**, Živanović MN, Milutinović MG, Đukić T, Radović M, Cvetković A, Gadjanski I, Filipović N, Marković S. Real-time monitoring of cytotoxic effects of electroporation on breast and colon cancer cell lines. Second Congress of the Serbian Association for Cancer Research "Cancer research: perspectives and application", Belgrade, 2015. pp. 24. ISBN:978-86-919183-0-9 (Meeting Abstract). **M34**
20. Živanović MN, **Cvetković DM**, Kosarić JV, Curčić MG, Seklić DS, Bugarcic ZM, Marković SD. Antioxidative effects of novel selenium compounds (Meeting Abstract). FEBS journal. 2012; 279: 197-197. ISSN: 1742-464X. **M34**
21. Curčić MG, Stanković MS, Seklić DS, Živanović MN, **Cvetković DM**, Marković SD. Total phenolic content and in vitro antioxidant/prooxidant properties of leaves and fruits from *Ligustrum vulgare* L (Meeting Abstract). FEBS journal. 2012; 279:216-216. ISSN: 1742-464-X. **M34**
22. Đačić DS, **Cvetković DM**, Glođović VV, Radić GP, Trifunović SR, Marković SD. The Antiproliferative effects of cisplatin and butyl and pentyl esters of (S, S)-ethylenediamine-N, N'-di-2-propanoic and corresponding platinum(IV) complexes on human colon cancer cell lines. Scientific Conference with International Participation "Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research", Kragujevac 2011, p12. ISBN 978-86-7760-064-8. **M34**
23. **Đuričić DM**, Đačić DS, Obradović AD, Đorđević NZ, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Marković SD. Redox status in plasma and red blood cells of cisplatin, vitamin C and selenium co-treated rats. X Congress of Romanian Society of Physiological Sciences, June, 2008, Cluj-Napoca, Romanian, Oxidative Stress in Medicine 18, PP. **M34**
24. Đačić DD, **Đuričić DM**, Žižić JB, Milošević MM, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić R, Saičić ZS, Marković SD. Effects of cisplatin, vitamin c and selenium co-treatment on hematological parameters in rats. Oxidative Stress in Medicine. X Congress of Romanian Society of Physiological Sciences, Cluj-Napoca, Jun 2008,p. **M34**

Г. Саопштења на научним конференцијама националног значаја (M60)

25. Ćurčić MG, Stanković MS, Mrkalić EM, Matović ZD, Đačić DD, **Cvetković DM**, Živanović MN, Marković SD. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti metanolnih ekstrakata biljke *Ligustrum vulgare* L. na HCT-116 ćelijskoj liniji u zavisnosti od vremena izlaganja i u kotretmanu sa kompleksom paladijuma. Kongres "Mitohondrije i slobodni radikali", Beograd, 2011, knjiga sažetaka. **M64**
26. **Cvetković DM**, Ćurčić MG, Đačić DD, Stanković MS, Marković SD. Ispitivanje antiproliferativnih i antioksidacionih svojstava metanolnih ekstrakata dobijenih iz listova i plodova biljke *Ligustrum vulgare* L. na HCT-116 ćelijskoj liniji. Kongres "Mitohondrije i slobodni radikali", Beograd, 2011, knjiga sažetaka. **M64**
27. Đačić DD, Stanković MS, Glođović VV, Radić GP, Trifunović SR, Ćurčić GM, **Cvetković DM**, Živanović MN, Marković SD. Sinergistička aktivnost gljive *Fellinus luteus* i kompleksa platine (IV) [Pt (dp-(S, S)-eddp)] na ćelijsku liniju humanog kolon kancera (HCT-116). Kongres "Mitohondrije i slobodni radikali", Beograd, 2011, knjiga sažetaka. **M64**

28. Šeklić DD, Mitrović T, Stamenković SM, Cvetković V, Radenković J, Ćurčić MG, Živanović MN, **Cvetković DM**, Marković SD. Citotoksični i prooksidacioni efekti ekstrakata lišajeva (*Pseudoevernia furfuracea* i *Platismatia glauca*) na ćelijskim linijama humanog kolon kancera (HCT-116 i SW-480). Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, strana 53. **M64**
29. Šeklić DD, Stanković MS, Topuzović DM, Ćurčić MG, Živanović MN, **Cvetković DM**, Marković S. Prooksidativni i antimigratorni efekti ekstrakata medicinski značajnih gljiva u tretmanu ćelijskih linija humanog kolon kancera. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, strana 54. **M64**
30. Ćurčić MG, Stanković MS, **Cvetković DM**, Živanović MN, Marković SD. Prooksidacioni efekat i citotoksičnost ekstrakata biljke *Ligustrum vulgare* L. na ćelije karcinoma kolona. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, strana 71. **M64**
31. Ćurčić MG, Stanković MS, **Cvetković DM**, Šeklić DD i Marković SD. Efekti ekstrakata biljke *Teucrium chamaedrys* L. na apoptotski signalni put i redoks status ćelija karcinoma kolona. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, strana 64. **M64**

4. Име ментора са образложењем

Веће за Природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу на седници одржаној 09.09.2015. године, донело је одлуку број IV-01-485/10 којом се др **Снежана Марковић**, доцент у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија одређена за ментора ове докторске дисертације.

Доцент др Снежана Марковић се 23. године активно бави научно-истраживачким радом у области Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија и аутор/коаутор је преко 50 научних радова (SCI) од значаја за развој научне мисли у оквиру те области. Од тога, преко 30 публикација (SCI) су резултат испитивања биолошких ефеката и молекуларних механизма деловања активних супстанци (хемијски синтетисаних и изолованих из природних материјала) на имортализованим ћелијским линијама канцера, разумевања механизма малигнитета на ћелијском и молекуларном нивоу, као и испитивања молекуларних маркера метастатске инвазивности код пацијената са канцером дојке.

Доцент др Снежана Марковић је резултате свог научно-истраживачког рада публиковала у преко 220 библиографских јединица, укупан број хетероцитата је преко 620 (SCOPUS база); руководила је једним европским FP7 пројектом (CPCTAS, GA 206809; 2008-2011. г.), а тренутно је руководилац домаћег интердисциплинарног пројекта (ИИИ41010; 2011-2017. г.); оснивач је и активни учесник развоја Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију Факултета. Наставно-педагошким радом на ПМФу се бави пуних 17. година, активно је учествовала у развијању области Молекуларне биологије и молекуларне физиологије, увођењу нових курсева и усклађивању студијских програма на нивоу Србије са болоњским и европским стандардима; учесник је и један од главних носилаца Темпус пројекта (STERU, JEP-40053-2005). Ментор је две одбрањене докторске дисертације, и још три за које је одобрена тема.

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

На основу прегледаног рукописа докторске дисертације Комисија је утврдила да планирани обим експерименталног рада, научни и оквирни садржај рада, предмет, циљ и хипотезе, као и представљени резултати научно-истраживачког рада и њихов значај са становишта актуелности у области Биологије, у потпуности одговарају пријављеној теми „Улога молекуларних механизма неоангиогенезе као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке“, а добијени резултати представљају оригиналан научни допринос у области Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија.

ПРЕДМЕТ И САДРЖАЈ УРАЂЕНЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Рукопис докторске дисертације, коју кандидат **Данијела М. Цветковић**, обухвата сва поглавља предвиђена оквирним садржајем докторске дисертације. Дисертација, написана на 197 страна, обухвата следећа поглавља:

1. **Увод** (стр. 1-49) у коме су прегледом најновијих литературних података детаљно објашњени карцином дојке (епидемиологија, етиологија, молекуларни механизми); молекуларни механизми и сигнални путеви неоангиогенезе: хелијске линије карцинома дојки као модел системи за преклиничка тестирања различитих видова терапије; data-mining.
2. **Хипотезе и циљеви истраживања** (стр. 50-51).
3. **Методологија истраживања** (стр. 52-68) у оквиру које су јасно објашњени критеријуми за укључивање пацијената са канцером дојки у студију, припрема ткива за анализу, методологија праћења генске експресије у реалном времену (*Quantitative / Real Time PCR*), као и праћење протеинске експресије имунофлуоресцентном микроскопском методом; методологија испитивања вијабилности хелија у реалном времену (*Real Time Cell Analysis-RTCA*, применом *xCELLigence* система) и начини извођења електропорације, електрохемотерапије и фитотерапије; принципи data-mining анализе.
4. **Резултати истраживања** (стр. 69-118) су детаљно објашњени и представљени са 9 Табела, 39 Графикана и 5 слика.
5. **Дискусија** (стр. 119-153) обухвата детаљно сагледавање и објашњење добијених резултата у односу на преглед литературе у области истраживања дисертације, а специфично у односу на следеће теме: (а) молекуларни параметри неоангиогенезе у ткиву карцинома дојки, (б) примена нестандарних модалитета лечења, (в) примена data-mining анализа.
6. **Закључци** (стр. 154-157) – општи, специфични и коначни.
7. **Литература** (стр. 158-180) обухвата 385. референци и 14 интернет извора.
8. **Прилози** (стр. 181-197) – (а) део резултата испитивања експресије рецептора CXCR-4 и VEGF_{165b} имунофлуоресцентном методом, који због количине и обима слика нису приказани у делу резултата, и (б) резултати data-mining анализе и нумеричке симулације урађене у сарадњи са истраживачима Факултета инжењерских наука, а део су публикованих резултата кандидата.
9. **Остало** – сва поглавља која прате целину дисертације (Извод на српском и енглеском језику, Скраћенице, Попис слика, табела и графикана, Биографија и библиографија кандидата) и документација у складу са одговарајућим Правилницима Факултета и Универзитета.

Хипотезе дисертације

- ❖ Данашњи онколошки протоколи су превише крути и апроксимативни и донекле занемарују особности пацијента и биологију тумора сваког пацијента. Сходно томе, циљ коме тежи модерна онкологија је индивидуализација терапије, што је и основна премиса ове дисертације.
- ❖ Перитуморско ткиво представља активан чинилац у процесу туморогенезе и метастазирања.
- ❖ Неоангиогенеза је веома битан механизам у процесу развоја карциномске болести и молекуларни маркери који су у вези са овим механизмом могу се регистровати у туморском, али и у перитуморском ткиву.
- ❖ Електротерапија, електрохемиотерапија, као и фитотерапија могу бити корисни видови антинеопластичног третмана, самостално или у комбинацији са осталим стандардним видовима онколошке терапије.
- ❖ *Data mining* методологија је корисна за предикцију исхода болести код пацијената са карциномом дојке.

Циљеви дисертације

- Анализа молекуларних параметара неоангиогенезе протеинске експресије MMP-9, као и генске експресије *VEGF-A*, *HIF-1*, *CXCL-12* и *iNOS* у туморском и перитуморском ткиву код пацијента са карциномом дојке као једног од механизма који је круцијалан у процесу појаве и развоја тумора. Показати да је протеинска експресија CXCR-4 и VEGF_{165b} рецептора присутна и у туморском и перитуморском ткиву.
- Анализа утицаја електропорације и електрохемиотерапије на здравим и карциномским ћелијским линијама.
- Анализа утицаја биоактивних супстанци на здравим и карциномским ћелијским линијама.
- Обрада резултата помоћу модерних информационих технологија и софтвера за предвиђање исхода болести, што би резултирало протоколом лечења који је специфичан за сваког појединачног пацијента.

Резултати истраживања

- Концентрација MMP-9 је статистички значајно виша у перитуморском него у туморском ткиву пацијената са карциномом дојке. Повишене концентрације MMP-9 у перитуморском ткиву могу указати на групу пацијената са повишеним ризиком од настанка метастаза у аксиларним лимфним нодусима, што овај ензим чини значајним прогностичким маркером у смислу агресивности болести.
- Експресија иРНК *VEGF-A*, *HIF-1*, *CXCL-12*, и *iNOS* гена и протеинска експресија VEGF и CXCR-4 су углавном статистички значајно више у туморском него у перитуморском ткиву
- Експресија иРНК *VEGF-A* гена је висока код дукталних карцинома дојке. Уколико је тумор већих димензија, вишег градуса, са појавом секундарних депозита у аксиларним лимфним нодусима и експресија *VEGF-A* гена је већа. Висока експресија је показана и у групама пацијената са рецепторима PR+ и HER-2-.
- Са повећањем величине и градуса тумора опада експресија иРНК *HIF-1 α* гена у туморском, али значајно расте у перитуморском ткиву, које постаје његов доминантни извор. Експресија

HIF-1 α гена у туморском ткиву је у корелацији са појавом регионалних аксиларних или удаљених метастаза.

- Повишени нивои иРНК *CXCL-12* гена у перитуморском ткиву се налазе у случајевима Т3, N2 и G3 (висока агресивност или узнапредовали тумор), док повишене вредности у туморском ткиву указују на вероватну појаву удаљених метастаза. Туморско ткиво жена старијих од 40 година експримира знатно више *CXCL-12* гена него перитуморско ткиво, док је код млађих жена већа експресија у перитуморском ткиву.
- Експресија иРНК *iNOS* је повећана у туморском ткиву лобуларног карцинома дојке и градијски се повећава са порастом величине тумора, захваћеношћу лимфних нодуса, појавом удаљених метастаза и ниском диференцијацијом тумора.
- HER-2 негативна група пацијента има повећану концентрацију свих испитиваних параметара у односу на HER-2 позитивне пацијенткиње.
- Код узнапредовалих тумора, високе агресивности (Т3, N2 и G3) постоји велика разлика у продукцији испитиваних маркера између перитуморског и туморског ткива. Доминантну улогу у продукцији MMP-9, као и експресији иРНК *HIF-1 α* , *CXCL-12* има перитуморско ткиво, док туморско ткиво доминира у продукцији иРНК *VEGF-A* и *iNOS*.
- Различите здраве и карциномске ћелијске линије различито реагују на исти електропорацијски третман. За ћелијску линију SW-480 карцинома колоне, пронашли смо електропорацијске услове при којима долази до иреверзибилног оштећења карциномских, али не и контролних здравих MRC-5, hAoSm и HUVEC ћелијских линија, и то у опсегу 375-437.5 V cm⁻¹, док на испитиваној метастатској линији карцинома дојке MDA-MB-231 тај ефекат није било могуће постићи.
- Паклитаксел изазива значајну цитотоксичност на ћелијама карцинома дојке, док већу цитотоксичност, чак и у мањим концентрацијама изазива у комбинацији са електропорацијом тј. електрохемиотерапијским третманом.
- Тип ћелијске смрти зависи од услова електропорације, тј. примењене волтаже, дужине експозиције, али и од особина самих третираних ћелија.
- *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* показују антиинвазивни ефекат на метастатским ћелијама карцинома дојке.
- Најбоље резултате у предикцији петогодишњег преживљавања смо добили коришћењем Naive Bayes-NB алгоритма за класификацију, док смо најбоље резултате у предикцији појаве рецидива и метастаза добили коришћењем *Artificial neural networks-ANN* класификационог модела, када је била у питању база података са параметрима који се рутински прикупљају приликом дијагностичке и терапијске обраде оваквих пацијената. Када су накнадно уведена још 5 параметара у туморском и перитуморском ткиву који се рутински не одређују у клиничкој пракси најбољи резултати у предикцији појаве метастаза су постигнути коришћењем SVM *Support Vector Machine-SVM* алгоритма.
- Најбоље ранжирани атрибути у предикцији метастаза код пацијената са карциномом дојке су величина тумора, експресија иРНК *CXCL-12* гена у туморском ткиву, статус рецептора за естроген и HER-2, захваћеност лимфних нодуса, концентрација MMP-9 у перитуморском ткиву, експресија иРНК *HIF-1 α* у туморском ткиву, експресија иРНК *iNOS* у перитуморском ткиву и експресија иРНК *VEGF-A* гена у туморском ткиву.

Закључци

- Коришћењем описане методологије креира се биолошки и молекуларни профил тумора за сваког појединачног пацијента, што води индивидуализацији онколошке терапије, која неће одговарати само ригидним протоколима, већ биолошким карактеристикама тумора.
- Додатни видови лечења као што је електрохемиотерапија могу значајно повећати дејство примењеног антинеопластичног агенса. На тај начин се постиже локализована хемиотерапија, тј. постиже се веома висока концентрација антинеоопластичног агенса у карциномском ткиву, док веома мало лека одлази у слободну циркулацију, чиме се превенирају веома тешка нежељена дејства хемиотерапије која су неизбежна при стандардној апликацији, а са друге стране се повећава утицај лека на карциномско ткиво.
- Фитотерапија екстрактима *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* се може користити као суплемент стандардној онколошкој терапији, али су свакако потребна даља истраживања на том плану.
- *Data mining* методологија је веома корисна, јер аутоматизовано, али свакако уз надзор искусног клиничара може извршити селекцију најзначајнијих параметара који имају утицаја у процесу туморогенезе и метастазирања. Оваква компјутеризована обрада података веома значајна, поготово када се узме у обзир да се интерфејс софтвера може креирати тако да буде веома доступан крајњем кориснику. Креиран софтвер може са великом поузданошћу извршити предикцију исхода болести за сваког појединачног пацијента за кога су претходно експериментално и рутинском клиничком обрадом одређени *input* параметри. *Output* параметри су у овом случају били период 5-огодишњег преживљавања, појава рецидива и метастаза, што је довољно да клиничар на објективан начин одлучи који је оптималан терапијски модалитет за сваког изучаваног пацијента понаособ, што представља индивидуализацију, односно персонализацију онколошке терапије.

6. Применљивост и корисност резултата у теорији и пракси

Коришћењем методологије описане у овој докторској дисертацији, може се креирати биолошки и молекуларни профил тумора за сваког појединачног пацијента, што води индивидуализацији онколошке терапије, која неће одговарати само ригидним протоколима, већ биолошким карактеристикама тумора. Додатни видови лечења као што је електрохемиотерапија могу значајно повећати дејство примењеног антинеопластичног агенса. На тај начин се постиже локализована хемиотерапија, тј. постиже се веома висока концентрација антинеоопластичног агенса у карциномском ткиву, док веома мало лека одлази у слободну циркулацију, чиме се превенирају веома тешка нежељена дејства хемиотерапије која су неизбежна при стандардној апликацији, а са друге стране се повећава утицај лека на карциномско ткиво. Биоактивне супстанце из екстраката листова *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* се могу користити као суплементи стандардној онколошкој терапији. *Data mining* методологија је веома корисна, јер аутоматизовано, али свакако уз надзор искусног клиничара може извршити селекцију најзначајнијих параметара који имају утицаја у процесу туморогенезе и метастазирања. Оваква компјутеризована обрада података веома значајна, поготово када се узме у обзир да се интерфејс софтвера може креирати тако да буде веома доступан крајњем кориснику. Креиран софтвер може са великом поузданошћу извршити

предикцију исхода болести за сваког појединачног пацијента за кога су претходно експериментално и рутинском клиничком обрадом одређени *input* параметри. *Output* параметри су у овом случају били период 5-огодишњег преживљавања, појава рецидива и метастаза, што је довољно да клиничар на објективан начин одлучи који је оптималан терапијски модалитет за сваког изучаваног пацијента понаособ, што представља индивидуализацију, односно персонализацију онколошке терапије.

7. Начин презентовања резултата научној јавности

Резултати докторске дисертације су презентовани јавности као публикације у научним часописима и као презентације на конференцијама међународног значаја. **До сада је из докторске дисертације кандидата публикован један рад у међународном научном часопису категорије M21, два рада су на рецензији у часописима M22 и M23, и три сопаштења на конференцијама међународног значаја.** Осим наведених публикација, преко 90% референци у оквиру библиографије кандидата директно су везане за методологију испитивања дисертације - (а) преклиничка тестирања биоактивних супстанци и електромагнетног поља на здравим и карциномским ћелијским линијама, (б) клиничка испитивања карцинома дојке и креирање базе података.

Радови у часописима међународног значаја (M20):

1. **Cvetković DM, Živanović MN, Milutinović MG, Djukić TR, Radović MD, Cvetković AM, Filipović ND, Zdravković ND.** Real-time monitoring of cytotoxic effects of electroporation on breast and colon cancer cell lines. *Bioelectrochemistry* 2017; 113: 85-94. ISSN: 1567-5394. IF₂₀₁₆ 3.346. **M21**

Радови на рецензији:

Cvetkovic DM, Andjelkovic-Cirkovic BR, Ninkovic SM, Cvetkovic AM, Milosevic BZ, Filipovic ND. Intelligent system for estimation of survival rate, relapse and metastasis - a role in individualization of breast cancer therapy. *BMC Medical Informatics and Decision Making*. (Paper Accepted-Under Review). ISSN: 1472-6947. IF₂₀₁₅ 2.042. **M22**

Cvetković DM, Milošević BZ, Cvetković AM, Ninković SM, Jovankić JV, Dalibor V Jovanovic DV, Marković SD. The concentration of matrix metalloproteinase 9 in the tumor and peritumoral tissue as prognostic marker in breast cancer patients. *Vojnosanitetski Pregled* ISSN: 0042-8450. IF₂₀₁₆ 0.367. **M23 (Under Review)**

Међународне конференције (M30):

1. Jovankić J, **Cvetković D**, Milutinović M, Nikodijević D, Živanović M, Grbović F, Marković M. Molecular mechanisms of redox status and antitumor activity of extracts of invasive plant species (*Robinia pseudoacacia* and *Amorpha fruticosa*) in MRC-5 and MDA-MB-231 cell lines. Serbian Biochemical Society Sixth Conference "Biochemistry and Interdisciplinarity: Transcending the Limits of field". November 18, 2016, Belgrade; 123-125. **M34**
2. **Cvetković D, Živanović M, Milutinović M, Đukić T, Radović M, Cvetković A, Gadjanski I, Filipović N, Marković S.** Real-time monitoring of cytotoxic effects of electroporation on breast and colon cancer

cell lines. Second Congress of the Serbian Association for Cancer Research "Cancer research: perspectives and application", Belgrade, 2015. pp24 (Meeting Abstract) **M34**

3. Đukić TR, **Cvetković DC**, Radović MD, Zivanović MN, Filipović ND. Numerical modeling of behavior of cancer cells after electroporation. IEEE International Conference on Bioinformatics & Bioengineering (BIBE). 2015; p.-57, Belgrade, Serbia. ISBN 978-1-4673-7983-0. **M33**

Резултати ће бити презентовани и на јавној одбрани докторске дисертације, након прихватања овог извештаја од стране Наставно-научног већа Природно-математичког факултета и Већа за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу.

8. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

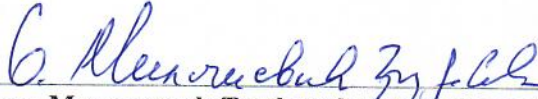
На основу прегледаног рукописа и достављеног материјала, Комисија сматра да је докторска дисертација кандидата **Данијеле М. Цветковић**, дипломираног биолога, под насловом *„Улога молекуларних механизма неоангиогенезе као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке“*, проистекла из оригиналног научно-истраживачког рада и да је заснована на савременим научним сазнањима са фундаменталним теоријским значајем у науци и широком потенцијалном примени у пракси.

Комисија сматра да су испуњени сви научни, стручни и административни услови за прихватање наведене докторске дисертације као оригиналног научног рада.

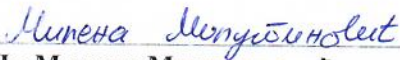
На основу наведених чињеница предлажемо Наставно-научном већу Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу да прихвати докторску дисертацију кандидата **Данијеле М. Цветковић** под називом „Улога молекуларних механизма неоангиогенезе као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке“, и спроведе даљу процедуру у циљу одобравања одбране докторске дисертације.

У Крагујевцу, 23.06.2017. године

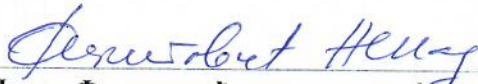
Комисија



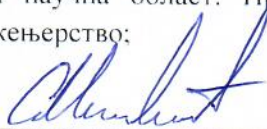
- 1 **Др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор**, председник Комисије
Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
ужа област: Генетика и еволуција;



- 2 **Др Милена Милутиновић, научни сарадник**
Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
научна област: Биологија



- 3 **Др Ненад Филиповић, редовни професор**
Факултет инжењерских наука, Универзитет у Крагујевцу
ужа научна област: Примењена механика и примењена информатика и рачунарско инжењерство;



- 4 **Др Срђан Нинковић, доцент**
Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
ужа научна област: Хирургија;



- 5 **Др Ивана Гађански, доцент**
BioSense Институт, Универзитет у Новом Саду,
Метрополитан универзитет, Београд,
Ужа научна област: Тективно инжењерство.