

Биолошки факултет
Број захтева: 33/144-1
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: **Биљана Б. Станковић**

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

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Молекуларни маркери поремећаја инфламације и апоптозе код инфламаторних болести црева“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 27.11.2014. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-5347/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Молекуларни маркери хроничне инфламације и апоптозе код инфламаторних болести црева“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 17.04.2015. год, одлуком Факултета под бр. 33/77-17.04.2015. 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 Горан Брајушковић | ванредни професор | биохемија и молекуларна биологија | Универзитет у Београду – Биолошки факултет |

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

33/144-12.6.2015.

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:

Биљане Станковић, под називом:

„Молекуларни маркери хроничне инфламације и апоптозе код инфламаторних болести црева“.

Универзитет је дана 27.11.2014. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-5347/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

Stanković B, Radlović N, Leković Z, Ristić D, Radlović V, Nikčević G, Kotur N, Vučićević K, Kostić T, Pavlović S, Zukic B. HLA genotyping in pediatric celiac disease patients. *Bosn J Basic Med Sci.* 2014 Aug 16; 14(3):171-6. **M23**

Jančić I, Arsenović-Ranin N, Sefik-Bukilica M, Zivojinović S, Damjanov N, Spasovski V, Srzentić S, **Stanković B**, Pavlović S. -174G/C interleukin-6 gene promoter polymorphism predicts therapeutic response to etanercept in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 2013; 33(6): 1481-6. **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 Биљане Б. Станковић, истраживача сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, под насловом: “Молекуларни маркери хроничне инфламације и апоптозе код инфламаторних болести црева” 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 Горан Брајушковић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Биљане Станковић је оригинално истраживање које за тему има хроничне инфламаторне болести црева (ХИБЦ). Студија је обухватила два типа ХИБЦ – инфламаторну болест црева (ИБЦ) (у коју спадају Кронова болест (КБ) и улцерозни колитис (УК)), и целијачну болест (ЦБ). Ове болести се карактеришу хроничним упалама дигестивног тракта које су изазване комбинацијом генетичких, срединских и имунолошких фактора. Истраживања у оквиру ове докторске дисертације бавила су се анализом молекуларне патогенезе КБ, УК и ЦБ и идентификацијом

молекуларних маркера који би могли да имају значај у предикцији и превенцији наведених болести. Такође, истраживања су се бавила анализом молекуларних маркера грануломатозних болести, у које спадају Кронова болест и реуматоидни артритис (РА).

Докторска дисертација Биљане Станковић је урађена у Лабораторији за молекуларну биомедицину на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду.

Докторска дисертација је написана на 137 страна и подељена је на 7 поглавља: Увод, Циљеви, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Осим тога, садржи и Резиме (на српском и енглеском језику). Дисертација садржи 19 слика, 24 табеле и 354 наслова у поглављу Литература који се адекватно наводе у тексту.

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Предмет докторске дисертације је идентификација молекуларних маркера ХИБЦ. Испитиван је ризик који одређене генетичке варијанте носе за појаву КБ, УК и ЦБ. Анализирани су варијанте у генима чији протеински производи учествују у регулацији имунског одговора, а то су бактеријски рецептори и инфламаторни цитокини. Такође, испитана је варијанта у гену за проинфламаторни цитокин чија је експресија важна за развој грануломатозних болести, у које спадају КБ и РА. С обзиром да су инфламација и апоптоза два процеса која су поремећена код ХИБЦ, анализирана је експресија проинфламаторних и апоптотских гена, како на месту локалне упале (интестинална мукоза), тако и системски (крв), код пацијената са КБ. Истраживање је обухватило и испитивање ДНК везујуће активности NF-κB, једног од главних регулатора транскрипције проинфламаторних и апоптотских гена, из мукозе пацијената оболелих од КБ.

У поглављу УВОД разматрана су савремена сазнања везана за патогенезу КБ, УК и ЦБ, са акцентом на подацима који доприносе разумевању молекуларне основе ових болести. Описана су досадашња сазнања везана за молекуларну основу грануломатозних формација код КБ и РА. Описане су функције имунских, инфламаторних и апоптотских гена испитиваних у студији, као и функција NF-κB, како у физиолошким условима, тако и током патогенезе наведених болести. Приказана сазнања истичу значај и актуелност

истраживања улоге ових молекуларних маркера у процесу развоја хроничних инфламаторних процеса у интестиналном ткиву.

Поглавље ЦИЉЕВИ садржи три јасно дефинисана основна циља овог истраживања. Као први циљ наведено је испитивање асоцијација одабраних генетичких варијанти са ризиком за појаву ХИБЦ и испитивање њиховог предиктивног значаја. Овај циљ је подељен у неколико фаза: испитивање асоцијација варијанти у генима *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC, Arg684Trp), *TLR4* (Asp299Gly, Thr399Ile), *TNF- α* (G-308A, G-238A), *IL-6* (G-174C), *IL-1 β* (C-511T) и *IL-1RN* (интрон 2 VNTR) са појавом КБ и УК; испитивање квалитета модела за предикцију КБ и УК који укључује информације о свим претходно анализираним генетичким варијантама; испитивање асоцијације варијанте гена *IL-6* G-174C са настанком КБ и РА, инфламаторних болести грануломатозног типа; испитивање дистрибуције генотипова *HLA-DQ* код пацијената са ЦБ и дефинисање ризика за настанак ЦБ који одређени генотипови носе. Као други циљ наведена је анализа нивоа експресије проинфламаторних (*TNF- α* и *IL-6*) и апоптотских гена (*Bcl-2*, *Bax*, *Fas* и *FasL*) код пацијената са КБ, како би се боље дефинисала њихова улога у патогенези болести и испитао дијагностички потенцијал. Овај циљ је подељен у две фазе: испитивање експресионих биомаркера у инфламацијом захваћеној и незахваћеној интестиналној мукози пацијената и испитивање ових биомаркера у мононуклеарним ћелијама периферне крви. Као последњи циљ наведено је испитивање ДНК везујуће активности NF- κ B из интестиналне мукозе пацијената оболелих од КБ који носе или ређи или учесталији генотип *NOD2*.

У оквиру поглавља МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ описана је група испитаника коју су чинили пацијенти са дијагностикованим КБ, УК, ЦБ и РА, као и контролна група коју су чинили здрави испитаници усклађени са групом пацијената по узрасту и полу. Узорци су прикупљени у сарадњи са Одељењем за гастроентерологију и хепатологију Клиничког центра Србија, Одељењем за гастроентеролошке и нутритивне поремећаје Универзитетске дечје клинике и Институтом за реуматологију Медицинског факултета у Београду. Детаљно су описане све примењене експерименталне процедуре. За детекцију генетичких варијанти коришћене су PCR-RFLP метода и PCR-SSP метода праћена фрагмент анализом.

За мерење нивоа експресије гена коришћена је qRT-PCR метода. ДНК везујућа активност NF-κB је испитана методом успорене електрофоретске покретљивости. За статистичку обраду података су коришћени непараметријски статистички тестови - χ^2 , Фишеров, Крускал-Волисов, Ман-Витнијев и Вилкоксонов тест ранга. За прављење предиктивних модела за настанак болести употребљени су алгоритми машинског учења у које су укључене све анализиране генетичке варијанте. За испитивање предиктивног значаја одабраних експресионих маркера коришћене су метода логистичке регресије и ROC анализа.

У поглављу РЕЗУЛТАТИ кандидаткиња је изложила резултате добијене наведеним истраживањима. Први део овог поглавља се односи на асоцијативну студију генетичких маркера код оболелих од ХИБЦ. Утврђено је да су мање учестале варијанте гена *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC, Arg684Trp) као и варијанте *TLR4* 299Gly, *TNF-α* -308A, *IL-6* -174C и *IL-1RN VNTR A2* асоциране са повећаним ризиком за настанак КБ, док је варијанта *IL-1RN VNTR A2* повезана са повећаним ризиком за настанак УК. Показана је значајна разлика у алелској дистрибуцији *TNF-α* G-308A између пацијената оболелих од КБ и УК, где је алел А повезан са присуством КБ, а алел G са присуством УК. Присуство КБ је асоцирано са комбинованим ефектом пола и мање учесталих варијанти у гену *TLR4*. Подаци о свим анализираним генотиповима коришћени су као улазне варијабле за неколико класификационих алгоритама у циљу дизајнирања модела за предикцију КБ и УК. Предиктивни модел је тачно класификовао пацијенте са КБ и здраве испитанике у 69% случајева, а пацијенте са УК и здраве испитанике у 60% случајева. Такође, резултати су показали да генетичка варијанта *IL-6* G-174C може бити потенцијални маркер грануломатозних болести, што је показано на примеру КБ и РА. Што се тиче ЦБ, показана је значајна асоцијација између комбинованог присуства алела *HLA-DQA1*05* и *-DQB1*02* и појаве болести. Такође, уочено је постојање градијента ризика за настанак ЦБ који је везан за специфичне генотипове *HLA-DQ*.

Други део поглавља РЕЗУЛТАТИ се односи на анализу експресије проинфламаторних и апоптотских гена код оболелих од КБ. Резултати анализе су показали да постоји значајан пораст нивоа експресије *IL-6* и *TNF-α*, а значајан пад нивоа

експресије *Bcl-2* у упаленој илеалној мукози пацијената. Повећање у нивоу транскрипције *IL-6* је израженије у односу на *TNF-α*. Резултати су указали и на потенцијални дијагностички значај нивоа експресије *IL-6* и *Bcl-2* у активној фази КБ. Поред наведене анализе у интестиналном ткиву, ниво транскрипције истих гена испитан је и у мононуклеарним ћелијама периферне крви. Резултати су у овом случају показали да је ниво експресије *FasL* значајно снижен код пацијената са КБ, али само код мушких испитаника. Поред тога, показано је да однос експресије *Fas/FasL* има предиктивни значај и представља потенцијални дијагностички биомаркер активне фазе болести код мушких пацијената.

Трећи део поглавља РЕЗУЛТАТИ односи се на испитивање ДНК везујуће активности NF-κB из узорака интестиналне мукозе пацијената са КБ. Анализа је показала асоцијацију смањеног нивоа NF-κB везујуће активности и повећаног нивоа експресије *TNF-α* са појавом фрагилне интестиналне слузнице. Насупрот томе, повећан ниво NF-κB везујуће активности и смањен ниво експресије *TNF-α* су показали асоцијацију са интестиналним стенозама.

У поглављу ДИСКУСИЈА добијени резултати су разматрани у односу на податке из литературе на тему молекуларне патогенезе КБ, УК и ЦБ. У првом делу дискусије изнета су запажања поткрепљена подацима из литературе о ризику који испитивани генетички маркери носе за развој анализираних болести. Објашњен је актулни приступ за употребу информација везаних за генетичке варијанте у предикцији појаве болести, а резултати предиктивних модела дизајнираних у овој студији су упоређени са већ постојећим у литератури. Дискутована је улога IL-6 у развоју болести које у својој основи имају грануломатозну формацију, посебно на примерима КБ и РА. У другом делу дискусије дато је разматрање резултата који се односе на анализу експресионих профила проинфламаторних и апоптотских гена специфичних за интестинално ткиво и крв пацијената са КБ. Ови резултати су дискутовани у светлу података познатих из литературе и разматран је њихов дијагностички и предиктивни значај. Трећи део дискусије разматра резултате који се односе на ДНК везујућу активност NF-κB у интестиналном ткиву пацијената са КБ. У овом делу се објашњава веза између интезитета ДНК-NF-κB

комплекса, нивоа експресије *TNF-α* и клиничког фенотипа детектованог код пацијената одабраних на основу *NOD2* статуса.

У поглављу ЗАКЉУЧЦИ, сажето и јасно је изнето 7 закључака који у потпуности произилазе из добијених резултата.

БИБЛИОГРАФИЈА

Биљана Станковић је публиковала 7 научних радова у часописима са СЦИ листе и учествовала са 23 саопштења на међународним научним скуповима и 1 саопштењем на скупу националног значаја, што укупно чини 31 библиографску јединицу. Два публикована рада и 5 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 М23

Stanković B, Radlović N, Leković Z, Ristić D, Radlović V, Nikčević G, Kotur N, Vučićević K, Kostić T, Pavlović S, Zukic B. HLA genotyping in pediatric celiac disease patients. *Bosn J Basic Med Sci*. 2014 Aug 16; 14(3):171-6.

Jančić I, Arsenović-Ranin N, Sefik-Bukilica M, Zivojinović S, Damjanov N, Spasovski V, Srzentić S, **Stanković B**, Pavlović S. -174G/C interleukin-6 gene promoter polymorphism predicts therapeutic response to etanercept in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 2013; 33(6): 1481-6.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја М34

B Stankovic, S Dragasevic, N Kotur, G Nikcevic, D Popovic, A Sokic-Milutinovic, S Lukic, T Alempijevic, M Krstic, S Srzentic, K Klaassen, B Zukic, T Milosavljevic, S Pavlovic. Inflammatory bowel disease in Serbian population: association of proinflammatory gene variants with the disease and their combined contribution in the prediction of disease development. 2014 Golden Helix Summer School- "Pharmacogenomics and Genomic Medicine - Bridging research and the clinic", 11-15 September, 2014, Aegina Island, Greece. Abstract book: p82.

Biljana Stankovic, Nikola Kotur, Sanja Srzentic, Kristel Klaassen, Nedeljko Radlovic, Zoran Lekovic, Dragana Ristic, Vladimir Radlovic, Gordana Nikcevic, Tatjana Kostic, Sonja Pavlovic, Branka Zukic. HLA-DQ Haplotypes in Serbian Pediatric Celiac Disease Patients and Association

with Lactase Deficiency. Up Close and Personalized, The 3rd International Congress on Personalized Medicine, 26-29 June, 2014. Prague, Czech Republic. Abstract book: p61.

Nikcevic G, **Stankovic B**, Dragasevic S, Kotur N, Popovic D, Sokic-Milutinovic A, Lukic S, Alempijevic T, Srzentic S, Zukic B, Krstic M, Milosavljevic T, Pavlovic S. CARD15, IL-6 and TNF- α genetic variations in association with Crohn's disease in Serbian population. RE(ACT), 5-8 March, 2014, Basel, Switzerland.

Dragasevic S, **Stankovic B**, Popovic D, Sokic-Milutinovic A, Lukic S, Alempijevic T, Nikcevic G, Zukic B, Pavlovic S, Krstic M, Milosavljevic T. Genetic variations of CARD15, IL-6 and TNF- α in association with Crohn's disease in Serbian population. Bridging Meeting, 15-16 November, 2013, Berlin, Germany.

Stanković B, Radlović N, Leković Z, Ristić D, Radlović V, Nikčević G, Kotur N, Karan-Đurašević T, Kostić T, Pavlović S, Zukić B. HLA genotyping in Serbian pediatric celiac disease patients. AABC, 10-12 October, 2013, Bled, Slovenia, Abstract book: p120.

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу изложене анализе, Комисија закључује да докторска дисертација Биљане Станковић представља оригинални допринос истраживањима на пољу хроничних инфламаторних болести црева и грануломатозних болести. Добијени резултати значајни су за боље разумевање молекуларне основе Кронове болести, улцерозног колитиса и целијачне болести, као и реуматоидног артритиса. Такође, они указују на потенцијану употребу испитиваних молекуларних маркера у предикцији и дијагнози анализираних болести. До сада на српској популацији није рађена студија која је проучавала асоцијацију и предиктивну употребу биомаркера испитиваних у овој студији.

У изради дисертације, кандидаткиња Биљана Станковић је показала изузетан степен познавања основне научне проблематике, самосталност у постављању хипотеза и циљева, приступању експерименталним задацима и оригиналност у доношењу закључака.

Током израде докторске дисертације, кандидаткиња је применила адекватне методе истраживања и обраде добијених резултата, које је критички дискутовала уз исцрпне податке из литературе.

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 Биљане Станковић под насловом: “Молекуларни маркери хроничне инфламације и апоптозе код инфламаторних болести црева”.

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 Горан Брајушковић, ванредни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду