

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО- НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИЈАВЉЕНО		30.03.2023	
Орг.јед.	Број	Датум	Средност
05	2789		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број Број: IV-03-72/28 од 21.02.2023. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата Амре Рамовић Хамзагић и предложених коментора за израду докторске дисертације под називом:

„Анализа предикције матичности карцинома дојке и колона у третману хемиотерапеутицима применом алата математичког моделирања“

Чланови комисије су:

1. **НС Драгана Шеклић**, научни сарадник Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биологија, председник;
2. **др Марина Газдић Јанковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, члан;
3. **др Владимир Перовић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Имунологија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно- научном већу Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидаткиња **Амра Рамовић Хамзагић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације

Карциноми дојке и колона су једни од најчешће дијагностикованих карцинома код оба пола. Познато је да поред разних ћелијских типова заступљених у карциному, малу али не мање значајану фракцију ћелија чине карцином матичне ћелије (енг. *cancer stem cells* - CSC). CSC имају улогу у расту карцинома, одговорне су за настанак метастаза као и за резистенцију карцинома на хемиотерапеутике (Sreepadmanabh и Toley, 2018). Анализа матичности релативно је нов приступ сагледавања карцинома. Одређивање заступљености матичних ћелија на основу маркера матичности је један од начина процене и прогнозе карциномске болести. Прегледом досадашњих истраживања, утврђено је да је присуство маркера CD24, CD44, ABCG2 и ALDH1, као и разлике у комбинацијама ова четири маркера могу бити довољна за карактеризацију популације матичних ћелија. Литературни подаци показују да примена стандардне хемиотерапије (5-флуороурацила, леуковорина, иринотекана и оксалиплатине за карцином колона или доксорубицина, ендоксана, паклитаксела и доцетаксела за карцином дојке) може да фаворизује популацију CSC у тим туморима. Такође, новије студије показују да постоји значајан утицај полистиренске нанопластике како на индукцију и развој, тако и на напредовање различитих типова карцинома. Оскудни су подаци о утицају ових наночестица на експресију маркера CSC. Употреба рачунарских модела омогућава проучавање биолошких феномена са променљивим временским скалама. Процена заступљености појединих популација матичних ћелија у популацији ћелија која има повећан пролиферативни капацитет, као и карактеризација фракција са највећом матичношћу у функцији третмана/котретмана и времена уз коришћење одговарајућих рачунарских модела даје нов научни приступ овом проблему.

2.2. Процена научног доприноса крајњег исхода рада

Комерцијални хемиотерапеутици утичу на значајно повећање заступљености канцерских матичних ћелија у популацији туморских ћелија на испитиваним ћелијским линијама карцинома дојке и колона, чак и ако се сам број туморских ћелија значајно смањује што представља научни допринос овог истраживања. Ова студија показује да широко коришћени, стандардни хемиотерапеутици фаворизују одређене популације ћелија међу

којима су канцерске матичне ћелије. Кроз ово истраживање ће бити показано да се примењена терапија у одређеним околностима заправо појачава агресивност канцера и његову отпорност према терапији и да томе значајно доприноси присуство полистиренске нанопластике. Ова студија показаће заступљеност канцерских матичних ћелија са акцентом на њихово нежељено повећање у корелацији са временом, типом карцинома и током терапије, што даје нов научни приступ проучавању ефеката терапеутика. Резултати математичког моделирања показаће да је од могућих 16 комбинација четири коришћена маркера матичности, оптималан тек мали део, што представља важан научни допринос. Са друге стране, употребом математичког моделирања повећава се могућност предвиђања неизмерених параметара као и оптимизација експеримената што представља допринос у делу који се тиче планирања експеримента и оптимизације протокола.

2.3. Наслов, циљ и хипотезе докторске дисертације

Наслов: Анализа предикције матичности карцинома дојке и колона у третману хемотерапеутицима применом алата математичког моделирања

Циљ: Испитивање утицаја хемотерапеутика на експресију маркера матичности у ћелијским линијама карцинома дојке и колона, са или без присуства полистиренске нанопластике. Анализа добијених података уз помоћ алата математичког моделирања у смислу оптимизације броја комбинација маркера матичности и заступљености испитиваних маркера.

Хипотезе:

1. H_0 хипотеза: Не постоји комбинација четири маркера матичности која је оптималнија у односу на стандардне, посебно у корелацији са типом тумора и примењене терапије.

H_1 хипотеза: Поред неколико стандардних комбинација неких од четири понуђена маркера матичности, постоји комбинација која је оптималнија, посебно у корелацији са типом тумора и примењене терапије.

2. H_0 хипотеза: RTCA метода праћења ћелијске вијабилности није супериорнија у овој врсти испитивања од класичног МТТ теста.

H_1 хипотеза: RTCA метода праћења ћелијске вијабилности супериорнија је у овој

врсти испитивања од класичног МТТ теста.

3. H0 хипотеза: Варијације у променама у тумору током терапије не утичу значајно на промене у матичности туморских ћелија, тј, на њихов метастатски потенцијал.

H1 хипотеза: Варијације у променама у тумору током терапије значајно утичу на промене у матичности туморских ћелија, тј, на њихов метастатски потенцијал.

4. H0 хипотеза: Полистиренска нанопластика не повећава експресију маркера матичности.

H1 хипотеза: Полистиренска нанопластика повећава експресију маркера матичности.

5. H0 хипотеза: Методе математичког моделирања нису супериорне у односу на класичну анализу биолошких параметара.

H1 хипотеза: Методе математичког моделирања су супериорне у односу на класичну анализу биолошких параметара.

2.4. Методе истраживања

2.4.1. Врста студије

Истраживање ће бити реализовано као експериментална студија *in vitro* на ћелијским линијама.

2.4.2. Ћелијске линије карцинома колона и дојке

У експериментима ће се користити комерцијална линија канцера колона, HCT-116, ћелијској линији канцера дојке, MDA-MB-231, као и здрава ћелијска линија фибробласта изолованих из плеуре плућа, MRC-5. За култивацију наведених ћелија користиће се *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) у који је додат *Fetal Bovine Serum*, *L-glutamine*, *penicillin/streptomycin* и неесенцијалне аминокиселине. Ћелије ће се узгајати у инкубатору на 37°C са 5% CO₂.

2.4.3 Узорковање

Хемиотерапеутици

У истраживању ће се користити комерцијално доступни хемиотерапеутици, који се примењују у клиничком третирању тумора: 5-флуороурацил, леуковорин, иринотекан и оксалиплатина на ћелијама канцера колоне, HCT-116; доксорубицин, ендоксан, паклитаксел и доцетаксел на ћелијама канцера дојке, MDA-MB-231, као и утицај свих ових цитостатика на здравој ћелијској линији фибробласта изолованих из плеуре плућа, MRC-5.

Полистиренска нанопластика

У истраживању ће се користити флуоросцентно обележена полистиренска нанопластика величине 40 nm и 200 nm.

Проточна цитометрија

Проточна цитометрија ће бити примењена на хуманим ћелијским линијама карцинома дојке и колоне. Култивисане ћелијске линије карцинома дојке и колоне, у присуству хемиотерапеутика, као и контролне без третмана, ће бити обележене флуорохром-коњугованим моноклонским anti-human CD24, CD44 и ALDH1 антителима (BD Biosciences, SanJose, CA, USA) или одговарајућим изотипским контролама и инкубиране 30 минута на +4°C. У циљу трансмембранског бојења ћелијске линије ће бити фиксиране и пермеабелизоване употребом BD Cytotfix/Cytopermkit-a (BD Biosciences, SanJose, CA, USA) и обележене одговарајућим anti-human моноклонским антителима за ABCG2 (BD Biosciences, SanJose, CA, USA).

RTCA одређивање ћелијске вијабилности

Праћење ћелијског индекса третираних ћелија биће обављено коришћењем теста за одређивање ћелија у реалном времену на xCELLigence RTCA DP систему (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) према приручнику произвођача. Овај специјално интегрисани микроелектронски систем за биолошка мерења представља биосензоре који су лаки за коришћење и који прате адхезију и вијабилност ћелија у реалном времену. Што је већи број везаних (живих) ћелија на златној електроди у тој мери већа је импеданца која се мери.

qRT-PCR

Применом qPCR методологије за одређивање параметара генске експресије биће одређен ниво информационе RNK у зависности од врсте модел система и третмана, као и од времена примене хемотерапеутика.

2.4.4 Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: Третман ћелија хемотерапеутицима и/или полистеринском нанопластиком у *in vitro* условима.

Зависне варијабле:

- параметри матичности туморских ћелија (протеинска експресија)
- параметри вијабилности ћелија (RTCA)
- параметри апоптозе ћелија (генска експресија)

2.4.5 Снага студије и величина узорка

За *in vitro* истраживање величина узорка израчуната на основу података о процентуалној заступљености маркера CD44 канцерских матичних ћелија, у студији сличног дизајна (10). Студијски узорак је израчунат узимајући алфа (α) од 0.05 и снагу студије од 0.80 за Т -тест (два независна узорка), упоређујући групе између себе (у оба смера), према статистичком програму *G*Power 3*. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између група, утврђен је број *in vitro* тестова и он износи три за сваку од група.

2.4.6 Статистичка анализа

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, прво биће испитано да ли добијене вредности имају нормалну расподелу (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Ако је број анализираних вредности већи од 50 користиће се *Kolmogorov- Smirnov* тест, а уколико је мањи од 50 за проверу користиће се *Shapiro-Wilk* тест. Уколико вредности имају нормалну расподелу користиће се параметарски *Student*-ово t тест, док у случају када вредности немају нормалну расподелу биће коришћен непараметарски *Mann-*

Whitney-ев тест. Резултати експеримента биће изражени као средња вредност \pm стандардна грешка (енгл. *Standard Error*, SE). За статистички значајну разлику у добијеним вредностима између група сматраће се када је $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.01$.

2.5. Значај истраживања за развој науке

Ово истраживање може дати нове податке о утицају хемиотерапеутика на ћелијску структуру и вијабилност, као и на нежељено повећање удела канцерских матичних ћелија у тумору током терапије. Како се у литератури углавном користи неколико комбинација ова четири маркера матичности, показаће се да је од могућих 16 комбинација анализе ових маркера оптималан тек мали део. Са друге стране, употребом математичких метода моделирања повећаће се капацитет одређивања великог броја биолошких параметара са могућношћу предвиђања неизмерених параметара.

Резултати овог истраживања имају значајан потенцијал за публикавање у престижним научним часописима из области онкологије, генетике, биологије матичних ћелија и имунологије и могу бити основа за будућа истраживања сличног циља и дизајна.

2.6. Образложење теме докторске дисертације и оригиналност идеје

Канцерске матичне ћелије и варијабилно диференциране туморске ћелије које чине пролиферативни пул карцинома могу потенцијално допринети толеранцији на хемотерапију. Резултати скорашње студије показују да је у животној средини све више присутна полистиренска нанопластика која утиче на фертилитет, понашање и модулише имунски одговор. У том смислу, важно је испитати утицај ове нанопластике на дејство хемиотерапеутика.

Конвенционални тестови (проточна цитометрија, микроскопија и МТТ) су до сада коришћени у одређивању пролиферације и вијабилности ћелија током третмана специфичним цитотоксичним агенсима. Међутим, ови тестови имају многе недостатке: они могу одредити само крајње физиолошко стање ћелија, због различитих корака укључених у протокол могу се добити лажно позитивни резултати, не постоје

информације о стању ћелија током периода третмана, осим ако нема много временских тачака, што само по себи може бити извор грешке. Сви такви тестови не дају тачан приказ стања ћелија током периода пролиферације или миграције, већ се мере крајње тачке. Тренутно, једини апарат помоћу кога се могу добити све временске тачке, са лакоћом и поновљивом прецизношћу је RTCA. Анализатор ћелија у реалном времену (енг. *Real time cell analyzer*, RTCA) је нова техника која омогућава праћење ћелијске пролиферације, миграције и цитотоксичности супстанци у директној или индиректној кокултури у реалном времену. На овај начин добијају се информације о стању ћелија у многобројним временским тачкама. Рачунарски модели (компјутерска симулација) омогућавају проучавање феномена са променљивим временским скалама, као и визуализацију тродимензионалне биолошке симулације. Рачунарско моделирање омогућава увид у појаве са променљивим временским скалама и омогућава визуелизацију тродимензионалних биолошких симулација. Са друге стране, употреба метода математичког моделирања у анализи резултата протеомике (и геномике) може значајно унапредити разумевање процеса који се заправо одвијају у ћелији. На овај начин, у оквиру ове докторске дисертације, биће анализирани резултати одређивања 4 маркера матичности (CD24, CD44, ABCG2 и ALDH1), где ће се од могућих 16 комбинација анализе ових маркера одабрати најоптималнији у корелацији са применом комерцијалних хемотерапеутика у анализи и третману канцера колона и дојке.

2.7. Кратка биографија и научно-истраживачки рад кандидата

Амра Рамовић Хамзић рођена је 15.03.1993. године у Београду. Основну школу је завршила у Новом Пазару, а средњу школу у Сарајеву. Основне и мастер студије завршила је на Бурч Универзитету у Сарајеву, чиме је стекла звање магистар генетике и биоинжињеринга. 2017. године уписала је Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје матичне ћелије у биомедицинским наукама. Од 2017. године запослена је као сарадник у настави на одсеку за биомедицинске науке на Државном универзитету у Новом Пазару.

Кандидаткиња је као први аутор објавила један рад у целини у часопису категорије M51, чиме је испунила услов за пријаву докторске дисертације:

1. **Amra Ramovic Hamzagic**, Dragica Miloradovic, Dragana Miloradovic, Zeljko Ivošević, Biljana Ljujić. Mesenchymal stem cells versus covid-19. Can they win the battle? Ser J Exp Clin Res. 2021; DOI: 10.2478/sjecr-2021-0024 (**M51**).

3. Предлог ментора

За коменторе ове докторске дисертације предлажу се се проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, и ВНС Марко Живановић, виши научни сарадник Института за информационе технологије, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Биологија. Предложени коментори испуњавају све услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9 за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност коментора

Проф. др Биљана Љујић

1. Nikolic S, Gazdic-Jankovic M, Rosic G, Miletic-Kovacevic M, Jovicic N, Nestorovic N, Stojkovic P, Filipovic N, Milosevic-Djordjevic O, Selakovic D, Zivanovic M, Seklic D, Milivojević N, Markovic A, Seist R, Vasilijic S, Stankovic KM, Stojkovic M, **Ljujić B**. Orally administered fluorescent nanosized polystyrene particles affect cell viability, hormonal and inflammatory profile, and behavior in treated mice. *Environmental Pollution*. 2022;305:119206.
2. Demetriades M, Zivanovic M, Hadjicharalambous M, Ioannou E, **Ljujić B**, Vucicevic K, Ivošević Z, Dagovic A, Milivojevic N, Kokkinos O, Bauer R, Vavourakis V. Interrogating and Quantifying In Vitro Cancer Drug Pharmacodynamics via Agent-Based and Bayesian Monte Carlo Modelling. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):749.
3. Kovacevic Z, Lazarevic T, Maksimovic N, Grk M, Volarevic V, Gazdic Jankovic M, Djukic S, Janicijevic K, Miletic Kovacevic M, **Ljujić B**. Galectin 3 (LGALS3) Gene Polymorphisms Are Associated with Biochemical Parameters and Primary Disease in Patients with End-Stage Renal Disease in Serbian Population. *J Clin Med*. 2022 Jul 4;11(13):3874.
4. Postolović KS, Antonijević MD, Ljujić B, Miletić Kovačević M, Gazdić Janković M, Stanić ZD. pH-Responsive Hydrogel Beads Based on Alginate, κ-Carrageenan and Poloxamer

for Enhanced Curcumin, Natural Bioactive Compound, Encapsulation and Controlled Release Efficiency. *Molecules*. 2022;27(13):4045.

5. Postolović K, **Ljujić B**, Kovačević MM, Đorđević S, Nikolić S, Živanović S, Stanić Z. Optimization, characterization, and evaluation of carrageenan /alginate/poloxamer/ curcumin hydrogel film as a functional wound dressing material. *Materials Today Communications*. 2022;31:103528.

Виши научни сарадник Марко Живановић

1. Nikolic S, Gazdic-Jankovic M, Rosic G, Miletic-Kovacevic M, Jovicic N, Nestorovic N, Stojkovic P, Filipovic N, Milosevic-Djordjevic O, Selakovic D, **Zivanovic M**, Seklic D, Milivojević N, Markovic A, Seist R, Vasilijic S, Stankovic KM, Stojkovic M, Ljujic B. Orally administered fluorescent nanosized polystyrene particles affect cell viability, hormonal and inflammatory profile, and behavior in treated mice. *Environmental Pollution*. 2022;305:119206.

2. Demetriades M, **Zivanovic M**, Hadjicharalambous M, Ioannou E, Ljujic B, Vucicevic K, Ivosevic Z, Dagovic A, Milivojevic N, Kokkinos O, Bauer R, Vavourakis V. Interrogating and Quantifying In Vitro Cancer Drug Pharmacodynamics via Agent-Based and Bayesian Monte Carlo Modelling. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):749.

3. Papic M, Zivanovic S, Vucicevic T, Papic M, Zdravkovic D, Milivojevic N, Virijevec K, **Zivanovic M**, Mircic A, Ljujic B, Lukic M, Popovic M. Pulpal expression of erythropoietin and erythropoietin receptor after direct pulp capping in rat. *Eur J Oral Sci*; 2022, doi.org/10.1111/eos.12888.

4. Arsenijevec N, Selakovic DV, Katanic-Stankovic JS, Mihailovic VB, Mitrovic SLj, Milenkovic J, Milanovic P, Vasovic MR, Markovic SD, **Zivanovic MN**, Grujic JN, Jovicic NU, Rosic GL. The Beneficial Role of Filipendula ulmaria Extract in Prevention of Prodepressant Effect and Cognitive Impairment Induced by Nanoparticles of Calcium Phosphates in Rats. *Oxid Med Cell Longev*; 2021; doi: 10.1155/2021/6670135.

5. Jovanovic-Stevic S, Radisavljevic SR, Scheurer A, Cocic DC, Smit BM, Petkovic MZ, **Zivanovic MN**, Virijevec KV, Petrovic BV. Bis(triazinyl)pyridine complexes of Pt(II) and Pd(II): studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/HSA interactions, molecular docking and biological activity. *J Biol Inorg Chem*; 2021, 26:625–637.

4. Научна област дисертације

Медицина.

Предмет истраживања се односи на анализу предикције матичности карцинома дојке и колоне у третману хемиотерапеутицима применом алата математичког моделирања. Предмет истраживања, циљ и постављене хипотезе и методолошки приступ истраживању су међусобно усклађени, а предложени ментор има научне компетенције које су подударне са предметом истраживања.

5. Научна област чланова комисије

- 1. НС Драгана Шеклић**, научни сарадник Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биологија, председник;
- 2. др Марина Газдић Јанковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, члан;
- 3. др Владимир Перовић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Имунологија, члан.


Сви предложени чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Амре Рамовић Хамзагић имају стручне и научне компетенције подударне са предметом истраживања.

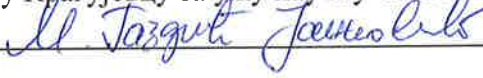
Закључак и предлог комисије

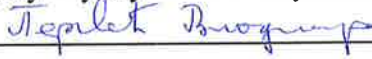
На основу увида у резултате досадашњег научно-истраживачког рада Амре Рамовић Хамзагић, комисија закључује да кандидат испуњава услове да приступи изради докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Амре Рамовић Хамзагић под називом „Анализа предикције матичности карцинома дојке и колона у третману хемотерапеутицима применом алата математичког моделирања“.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **НС Драгана Шеклић**, научни сарадник Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биологија, председник


2. **Доц. др Марина Газдић Јанковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, члан;


3. **Доц. др Владимир Перовић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Имунологија, члан;


У Крагујевцу, 08.03.2023.