

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРЕМИЈА		18.07.17	
Служба			
05	8881/5-5		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-689/39, од 05.07.2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Хелене Марић, под називом:

„Утицај полиморфизама гена за DNA метилтрансферазе на ток и исход меланома“

Чланови комисије су:

1. **проф. др Драгче Радовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник
2. **проф. др Јефта Козарски**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за уже научне области Пластична, реконструктивна и естетска хирургија и Микрохирургија и лечење опекотина, члан
3. **проф. др Дејан Вуловић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
4. **проф. др Наташа Ђорђевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан
5. **проф. др Звонко Магић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Биологија са хуманом генетиком, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Кандидат др Хелена Марић рођена је 11.06.1984. године у Фочи, где је завршила основну и средњу школу. Студије на Медицинском факултету у Фочи завршила је 2010. године, са просечном оценом 10,00 (десет), чиме је стекла стручно звање доктор медицине. Запослена је у Универзитетској болници у Фочи, Центар за хирургију на одсеку за пластичну и реконструктивну хирургију и опекотине. Специјализант је шесте године пластичне и реконструктивне хирургије на Медицинском факултету у Фочи Универзитета у Источном

Сарајеву. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Клиничка и експериментална хирургија, уписала је школске 2011/2012. године. Положила је усмени докторски испит. Запослена је и на Медицинском факултету у Фочи, где до данас обавља послове сарадника у настави у звању вишег асистента за ужу научну област Анатомија и морфологија. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Утицај полиморфизама гена за DNA метилтрансферазе на ток и исход меланомом“

Предмет: Одређивање учесталости полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193 и rs2424932), код 110 пацијената са примарним меланомом коже и утврђивање разлике у учесталости генотипова испитиваних полиморфизама и повезаности са клиничким параметрима болести, стадијумом, нодалним статусом, Breslow индексом, бројем митоза, присуством тумор инфилтришућих лимфоцита (TIL).

Хипотеза: Постоје разлике у учесталости генотипова полиморфизама у DNMT1 и/или DNMT3B гену између пацијената са узрапредовалим стадијумом меланомом (стадијум III, односно са метастазама лимфних чворова (N+)) у односу на пацијенте са раним стадијумом болести (I и II стадијум, без метастаза лимфних чворова (N-)).

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини у часопису категорије M23 у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Х Марић, Р Цвијановић, И Иванов, Љ Гвозденовић, Д Иванов, Н Лаловић. Периферни примитивни неуроектодермални тумор мезентеријума танког црева – приказ болесника. Srp Arh Celok Lek. 2015 Sep-Oct;143(9-10):619-622 **M23**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Меланом има изузетно велики социјално-здравствени значај са порастом инциденце у свету и код нас. Петогодишње преживљавање код пацијената код којих се болест открије у првој фази је 90%, док свега 15-20% преживи пет година уколико се при дијагнози открију и удаљене метастазе. Инциденца меланомом је највећа у Аустралији док је у Европи највећа инциденца у скандинавским земљама, а најнижа у јужној Европи. До скоро, лечење меланомом је било углавном хируршко док је цитостатска терапија имала мало ефекта. Тек увођењем биолошке терапије наступа значајно побољшање у лечењу и продужавања преживљавања болесника са меланомом. Ову терапију су омогућила сазнања из молекуларне генетике меланомом, те је отуда огроман интерес за новим сазнањима из

генетике и епигенетике меланома која би омогућила боље разумевање молекуларне основе меланома и указала на потенцијално нове облике терапије и нове биомаркере болести. Епигенетске промене су наследне промене генске експресије које за разлику од мутација немају промене у примарној нуклеотидној секвенци. Осим што су митотски наследне ове промене су и потенцијално реверзибилне, што пружа наду за увођење епигенетске терапије. Основни механизми епигенетске регулације су метилација DNA, модификације хистона и утицај регулаторних некодирајућих RNA (Ribonucleic acid) на генску експресију. Новија сазнања о учешћу модификације хистона у регрутовању DNA метилтрансфераза, метилацији DNA и микро RNA сугеришу да је иницијација епигенетског утишавања комплексно регулисана и да се механизми међусобно преплићу.

DNA метилација одржава велики део некодирајуће DNA у ћелијама виших организама у транскрипционо инертном стању (репетитивне секвенце, инсертоване виралне секвенце, транспозони), осигурава касну репликацију, омогућава инактивацију једног X хромозома код женског пола, омогућава алелску ексклузију код B лимфоцита и импринтинг гена код којих је само један алел експримиран у нормалном ткиву. Кључна епигенетска модификација код сисара је DNA метилација цитозина лоцираног узводно (5') од гуанозина у CpG динуклеотиду, која настаје након репликације. У реакцији модификације цитозина у метил-цитозин дозор метил групе је С-аденозил метионин, а ензими који катализују ову реакцију су фамилија ензима DNA-метилтрансферазе (DNMT). Дистрибуција CpG динуклеотида у геному је неравномерна и ови динуклеотиди су груписани у такозвана CpG острвца (*engl. "CpG islands"*). Ови региони су најчешће заступљени на местима почетка транскрипције, где око 50% гена у оквиру промотора има CpG острвца. Већина, око 80% CpG динуклеотида који нису у оквиру острвца су метиловани, док су у оквиру острвца промотора гена CpG динуклеотиди неметиловани, без обзира на то да ли је тај ген транскрибован.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Значај студије се огледа у томе што добијене разлике у учесталости генотипова у DNMT генима могу бити маркер тока и исхода болести и корелирати са временом преживљавања. Такође, постојање разлика би указало на потенцијалну повезаност полиморфизама у DNMT генима са прогресијом меланома. Полиморфизми у DNMT генима до сада нису истраживани код пацијената са меланомом.

Циљеви студије

1. Одредити учесталости полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193 и rs2424932), код пацијената са примарним меланомом коже, у различитим стадијумима болести,

2. Утврдити разлике у учесталости генотипова испитиваних полиморфизама и повезаност са:

- клиничким параметрима болести, стадијумом, нодалним статусом, Breslow индексом, бројем митоза, присуством тумор инфилтришућих лимфоцита (енгл. tumor infiltrating leukocytes- TIL). факторима ризика, годинама, изложености сунцу, фототипом коже. током и исходом болести, односно са укупним преживљавањем (Kaplan-Meier).

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Хиперметилација гена је једна од најчешћих епигенетских промена у хуманим туморима. Метилован цитозин је подложен спонтаној хидролитичкој деаминацији у тимидин. Ако ова мутација не буде отклоњена репарационим механизмима долази до нуклеотидне транзиције и С→Т транзиција је најчешћи вид генетског полиморфизма у хуманој популацији. Тако је хиперметилација истовремено и предиспозиција за мутације, па се често и означава као *парамутација*.

DNA-метилтрансферазе (DNMT) су фамилија ензима који катализују метилацију цитозина у оквиру CpG динуклеотида. DNMT1 је нуклеусни протеин који је дифузно локализован у нуклеоплазми током G1 и G2 фазе ћелијског циклуса, док је током S фазе повезан са местима репликације, што указује на повезаност метилације и репликације. Док су DNMT3A и DNMT3B углавном укључени у активну *de novo* метилацију, DNMT1 је укључена у одржавање DNA метилације након репликације. DNMT1 има 5 до 50 пута већи афинитет за везивање за хемиметилвану DNA и каталише трансфер метилгрупе на новонастали ланац DNA, ћерка ланац. DNMT3A и DNMT3B индукују *de novo* метилацију новоинтегрисаних паразитских DNA секвенци, катализују *de novo* метилацију током ембриогенезе или туморигенезе. *Knockout* врсте за било коју од DNMT су леталне. Неколико студија је показало повећане експресије DNMT ензима у већем броју типова канцера, укључујући карцином дојке (DNMT3B) и плућа (DNMT1), где је утврђено да прекомерна експресија DNMT директно корелира са лошом прогнозом.

Полиморфизми нуклеотидне секвенце (енгл. Single Nucleotide Polymorphism, SNPs) доводе до разлика у једном нуклеотиду у оквиру секвенце DNA и извор су генетичке варијабилности у популацији. Последњих година је за велики број типова тумора, укључујући и меланом, утврђена повезаност у учесталости генотипова различитих полиморфизама са предиспозицијом за настанак тумора, као и са прогресијом болести.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Планирана је неинтервентна, клиничка, ретроспективна студија током које ће се упоређивати тестирани параметри у експерименталној и контролној групи испитаника. Истраживање ће бити спроведено на Војно-медицинској академији- ВМА

Популација која се истражује

Истраживањем ће бити обухваћени болесници који се хоспитално лече у Клиници за пластичну хирургију ВМА и Клиници за Дерматологију ВМА. Након ресекције меланома и одређивања статуса сентинел лимфних чворова (енгл. sentinel lymph node, SLN) сви пацијенти ће бити приказани конзилијуму центра за меланом ВМА. Студија ће бити спроведена као академско и непрофитно истраживање према принципима Добре клиничке праксе и Хелсиншке декларације. Пре спровођења студије протокол истраживања и друга потребна документација су достављени ради мишљења и сагласности надлежном Етичком комитету ВМА (добијено је одобрење истог). Финансијски аспекти истраживања ће бити у складу са стандардима уобичајеним за домаћа академска истраживања и сходно некомерцијалној природи студије биће усмерени на обезбеђивање материјалних трошкова.

Узорковање

У студију ће бити укључени болесници мушког или женског пола животне доби од 18 до 75 година код којих је постављена дијагноза (клинички критеријуми, биопсијом и патохистолошки), урађена ресекција меланома и детекција сентинел лимфних чворова.

Укључујући критеријуми су:

- потписан добровољни пристанак за учешће у студији
- 1. **Експериментална група** - постављена дијагноза меланома, болесници у III стадијуму, односно са метастазама у лимфним чворовима (N+)
- 2. **Контролна група** – постављена дијагноза меланома, болесници у I и II стадијуму болести, односно без метастаза у лимфним чворовима (N-)

Учесталост полиморфизама и повезаност се клиничко-патолошким параметрима у групи пацијената са узнатредовалим стадијумом болести односно метастазама лимфних чворова (III стадијумом) ће бити упоређивани у односу на пацијенте са раним стадијумима болести одн. без метастаза лимфних чворова (I и II стадијум). Планира се да укупан број испитаника буде 110 (најмање по 40 у свакој групи).

Искључујући критеријуми:

1) болесници млађи од 18 и старији од 75 година, 2) недефинисан стадијум болести, 3) недостатак дијагностике сентинал лимфних чворова 4) друге малигне болести 5) претходна радио/хемиотерапија

План и процедуре студије

Сви испитаници ће бити лечени у Клиници за пластичну хирургију ВМА и Клиници за Дерматологију ВМА након приказивања конзилијуму за меланоме (Центар за меланоме ВМА). Свим испитаницима укљученим у студију биће урађена детекција SLN и патохистолошка и имунохемијска дијагностика у Институту за патологију ВМА (стадијум болести, нодални статус, Breslow индекс, број митоза, присуство тумор инфилтришућих лимфоцита- TIL). Код свих пацијената биће праћени период без болести, појава раних рецидива, укупно преживљавање и присуство/одсуство фактора ризика за појаву меланома.

Свим испитаницима укљученим у студију (110) одредиће се учесталост полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193 и rs2424932). Генетичке анализе биће рађене у Институту за медицинска истраживања ВМА. Полиморфизам нуклеотидне секвенце (SNP) гена за DNMT1 и DNMT3B одређиван је есејом алелске дискриминације (Allelic Discrimination), употребом ``TaqMan predesigned Genotyping SNP assay`` на Applied Biosystems 7500 Real-Time Fast апарату.

Геномска DNA изолована је из узорка периферне крви пацијената којој је додат антикоагуланс. За изолацију DNA коришћене су сепарационе колонице (Kit for extraction of genomic DNA, column based kit)

Варијабиле које се мере у студији

Независне варијабле: Меланом, DNMT1 и DNMT3B генотипови, односно алелске варијанте испитиваних гена .

Зависне варијабле: присуство/одсуство метастаза у лимфним чворовима као и вредности мерених параметара: Breslow индекс, бројем митоза и тумор инфилтришући лимфоцити.

„Збуњујуће“ варијабле: демографске карактеристике болесника са меланомом: старост, пол, етничка припадност; део тела на коме се налази меланом, фототип коже, изложеност сунцу

Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података публикованих у студијама сличног дизајна, коришћењем одговарајућег рачунарског програма, уз вероватноћу алфа грешке од 0.05, снагу студије 0.8, и дихотомно обележје посматрања (χ^2 тест). На овај начин, добијен је минимални број испитаника од 40 (снага студије 0.87) у свакој од група. Укупна величина узорка биће 110 болесника.

Статистичка обрада података

Добијени подаци ће бити анализирани у статистичком програму SPSS 20.0. Непараметријске променљиве ће бити анализирани χ^2 -тестом или Fisher-овим тестом, када је очекивана учесталост буде мања од 5. Укупно преживљавање ће бити процењивано помоћу Kaplan-Meier метода, а значајност одређивана log-rank тестом. Сви резултати ће бити сматрани значајним када p вредности буду мање од 0.05. Обрађени резултати ће бити приказани табеларно и графички.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да добијени резултати покажу разлике у учесталости генотипова полиморфизама у DNMT1 и/или DNMT3B гену између пацијената са узнапредовалим стадијумом меланома (III стадијум) у односу на пацијенте са раним стадијумом болести (I и II стадијум).

2.9. Оквирни садржај дисертације

Циљ ове тезе је да се одреди учесталост полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193 и rs2424932), код 110 пацијената са примарним меланомом коже и да утврди разлике у учесталости генотипова испитиваних полиморфизама и повезаност са клиничким параметрима болести, стадијумом, нодалним статусом, Breslow индексом, бројем митоза, присуством тумор инфилтришућих лимфоцита (TIL).

Проспективна студија у коју ће бити укључено 110 болесника са меланомом којима ће се уз клиничке параметре одређивати и генотипови у DNMT1 и DNMT3B генима.

На основу података из литературе очекује се разлика у учесталости генотипова полиморфизама у DNMT1 и/или DNMT3B гену између пацијената са узнапредовалим стадијумом меланома у односу на пацијенте са раним стадијумом болести (I и II стадијум).

Добијене разлике у учесталости генотипова у DNMT генима могу бити маркер тока и исхода болести и корелирати са временом преживљавања. Такође, постојање разлика би указало на потенцијалну повезаност полиморфизама у DNMT генима са прогресијом меланома.

3. Предлог ментора

За коменторе се предлажу:

проф. др Маријан Новаковић, редовни професор за ужу научну област Хирургија и **проф. др Звонко Магић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Биологија са хуманом генетиком.

Предложени наставници испуњавају услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност коментора

Радови у вези са темом докторске дисертације:

проф. др Маријан Новаковић:

1. Gačević M, Jović M, Zolotarevski L, Stanojević I, **Novaković M**, Miller K, Šuljagić V, Mijušković Ž, Vojvodić D,. Association of vascular endothelial growth factor expression with pathohistological parameters of cutaneous melanoma. *Vojnosanit pregl.* 2016;73(5):449-57
2. I. Stanojevic, M. Gacevic, M. Jovic, Ž. Mijuskovic, R. Zečević, L. Zolotarevski, Lj. Jauković, M. Rajovic, **M Novakovic**, K. Miller, I. Binić, D. Vojvodić: Interferon alpha-induced reduction in the values of myeloid-derived suppressor cells in melanoma patients. *Vojnosanitetski pregled. Military-medical and pharmaceutical review* 04/2015; 72(4):342-349. DOI:10.2298/VSP1504342S
3. B. Balint, N. Stepic, M. Todorovic, L. Zolotarevski, G. Ostojic, D. Vucetic, M. Pavlovic, **M. Novakovic**: Ibuprofen-induced extensive toxic epidermal necrolysis - A multidisciplinary therapeutic approach in a single case. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 07/2014; 12(3):438-9. DOI:10.2450/2014.0065-14.
4. **Novaković M**, Lukač M, Kozarski J, Stepić N, Đorđević B, Vulović D, Rajović M, Milev B, Milićević S. Principles of surgical treatment of congenital, developmental and acquired female breast asymmetries. *Vojnosanit pregl.* 2010; 67(4): 313-20.
5. Djordjević B, **Novaković M**, Milisavljević M, Milićević S, Maliković A, Surgical anatomy and hystology of the levator palpebrae superioris muscle for blepharoptosis correction. *Vojnosanit pregl.* 2013; 70 (12): 1124-1131.

проф. др Звонко Магић:

1. Supic G, Zeljic K, Rankov AD, Kozomara R, Nikolic A, Radojkovic D, **Magic Z**. miR-183 and miR-21 expression as biomarkers of progression and survival in tongue carcinoma patients. *Clin Oral Investig.* 2017 Jun 14. doi: 10.1007/s00784-017-2126-y

2. Zeljic K, Elkilany A, Supic G, Surbatovic M, Djordjevic D, **Magic Z**, Bozic B. Vitamin D receptor gene polymorphisms association with the risk of sepsis and mortality. *Int J Immunogenet.* 2017 Jun;44(3):129-134
3. Zeljic K, Supic G, **Magic Z**. New insights into vitamin D anticancer properties: focus on miRNA modulation. *Mol Genet Genomics.* 2017 Jun;292(3):511-524.
4. Mladenovic I, Supic G, Kozomara R, Dodic S, Ivkovic N, Milicevic B, Simic I, **Magic Z**. Genetic Polymorphisms of Catechol-O-Methyltransferase: Association with Temporomandibular Disorders and Postoperative Pain. *J Oral Facial Pain Headache.* 2016 Fall;30(4):302-310
5. Atanaskovic L1, Cikota-Aleksic B, Tarabar O, Trimcev J, Zivanovic-Ivic A, Marjanovic S, **Magic Z**. Clinical implications of glutathione S-transferase genotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J BUON.* 2016 Nov-Dec;21(6):1459-1465.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Клиничка и експериментална хирургија.

5. Научна област чланова комисије

1. **проф. др Драгче Радовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник
2. **проф. др Јефта Козарски**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за уже научне области Пластична, реконструктивна и естетска хирургија и Микрохирургија и лечење опекотина, члан
3. **проф. др Дејан Вуловић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
4. **проф. др Наташа Ђорђевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан
5. **проф. др Звонко Магић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Биологија са хуманом генетиком, члан

Закључак и предлог комисије

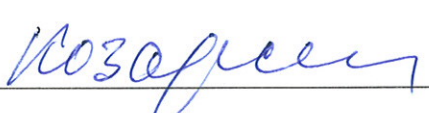
1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Хелене Марић, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да одреди учесталост полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193 и rs2424932), код пацијената са примарним меланомом коже и да утврди разлике у учесталости генотипова испитиваних полиморфизама и повезаност са клиничким параметрима болести, стадијумом, нодалним статусом, Breslow индексом, бројем митоза, присуством тумор инфилтришућих лимфоцита (TIL).
3. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Хелене Марић под називом „Утицај полиморфизама гена за DNA метилтрансферазе на ток и исход меланомома“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. проф. др Драгче Радовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник



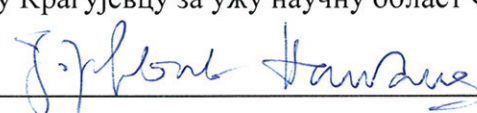
2. проф. др Јефта Козарски, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за уже научне области Пластична, реконструктивна и естетска хирургија и Микрохирургија и лечење опекотина, члан



3. проф. др Дејан Вуловић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан



4. проф. др Наташа Ђорђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан



5. проф. др Звонко Магић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Биологија са хуманом генетиком, члан



У Крагујевцу, 07.07.2017.