

Биолошки факултет
Број захтева:50/129-1
Датум: 14. 6. 2024.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно чл. 48 ст. 5 тач. 3) Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“ бр. 201/2018, 207/2019, 213/2020, 214/2020, 217/2020, 230/21, 232/22, 233/22 и 236/22), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Антитуморска активност екстраката и изолованих једињења из биљне врсте *Cotinus coggygia Scop.*”

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биолошке науке.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља и презиме кандидата:

Ивана А. Пашић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

3. Година дипломирања: 2020.

4. Година уписа на докторске студије: 2021/2022.

Универзитет у Београду - Биолошки факултет

5. Назив студијског програма докторских студија: Молекуларна биологија, модул: Молекуларна биомедицина.

6. Датум подношења пријаве теме докторске дисертације: 29. 4. 2024.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

А:

Име и презиме ментора: **др Ивана Матић,**

Звање: виши научни сарадник, Институт за онкологију и радиологију Србије.

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Preljević K, Pašić I, Vlaović M, **Matić IZ**, Krivokapić S, Petrović N, Stanojković T, Živković V, Perović S. Comparative analysis of chemical profiles, antioxidant, antibacterial, and anticancer effects of essential oils of two *Thymus* species from Montenegro. *Fitoterapia*. 2024;174:105871. doi: 10.1016/j.fitote.2024.105871.
2. **Matić IZ**, Mraković A, Rakočević Z, Stoilković M, Pavlović VB, Momić T. Anticancer effect of novel luteolin capped gold nanoparticles selectively cytotoxic towards human cervical adenocarcinoma HeLa cells: An *in vitro* approach. *J Trace Elem Med Biol*. 2023;80:127286. doi: 10.1016/j.jtemb.2023.127286.
3. Crnogorac MĐ, **Matić IZ**, Damjanović A, Janković N, Krivokuća A, Stanojković T. 3D HeLa spheroids as a model for investigating the anticancer activity of Biginelli-hybrids. *Chem Biol Interact*. 2021;345:109565. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109565.
4. **Matić IZ**, Ergün S, Đorđić Crnogorac M, Misir S, Aliyazicioğlu Y, Damjanović A, Džudžević-Čančar H, Stanojković T, Konanç K, Petrović N. Cytotoxic activities of *Hypericum perforatum* L. extracts against 2D and 3D cancer cell models. *Cytotechnology*. 2021;73(3):373-389. doi: 10.1007/s10616-021-00464-5.
5. Damjanović A, Kolundžija B, **Matić IZ**, Krivokuća A, Zdunić G, Šavikin K, Janković R, Stanković JA, Stanojković TP. *Mahonia aquifolium* Extracts Promote Doxorubicin Effects against Lung Adenocarcinoma Cells *In Vitro*. *Molecules*. 2020;25(22):5233. doi: 10.3390/molecules25225233.

Б:

Име и презиме ментора: **др Милош Бркушанин,**

Звање: научни сарадник, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Brkušaniin M**, Kosać A, Branković-Srećković V, et al. Phosphorylated neurofilament heavy chain in cerebrospinal fluid and plasma as a Nusinersen treatment response marker in childhood-onset SMA individuals from Serbia. *Front Neurol*. 2024;15:1394001. doi:10.3389/fneur.2024.1394001.
2. Djordjevic I, Garai N, Peric S, Karanovic J, Pesovic J, **Brkusaniin M**, Lavrnica D, Apostolski S, Savic-Pavicevic D, Basta I. Association between Cytotoxic T-

Lymphocyte-Associated Antigen 4 (CTLA-4) Locus and Early-Onset Anti-acetylcholine Receptor-Positive Myasthenia Gravis in Serbian Patients. *Mol Neurobiol.* 2024 Apr 23. doi: 10.1007/s12035-024-04183-8. Epub ahead of print. PMID: 38652350.

3. Matijašević Joković S, Korać A, Kovačević S, Djordjević A, Filipović L, Dobrijević Z, **Brkušanin M**, Savić-Pavićević D, Vuković I, Popović M, Brajušković G. Exosomal Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) and Caveolin-1 as Potential Biomarkers of Prostate Cancer-Evidence from Serbian Population. *Int J Mol Sci.* 2024 Mar 21;25(6):3533. doi: 10.3390/ijms25063533. PMID: 38542507; PMCID: PMC10970688.
4. Kosac A, Pesovic J, Radenkovic L, **Brkušanin M**, Radovanovic N, Djurisc M, Radiojevic D, Mladenovic J, Ostojic S, Kovacevic G, Kravljanac R, Savic Pavicevic D, Milic Rasic V. LTBP4, SPP1, and CD40 Variants: Genetic Modifiers of Duchenne Muscular Dystrophy Analyzed in Serbian Patients. *Genes (Basel).* 2022 Aug 4;13(8):1385. doi: 10.3390/genes13081385. PMID: 36011296; PMCID: PMC9407083.
5. Pešović J, Perić S, **Brkušanin M**, Brajušković G, Rakočević-Stojanović V, Savić-Pavićević D. Molecular genetic and clinical characterization of myotonic dystrophy type 1 patients carrying variant repeats within DMPK expansions. *Neurogenetics.* 2017 Dec;18(4):207-218. doi: 10.1007/s10048-017-0523-7. Epub 2017 Sep 23. PMID: 28942489.

Обавештамо вас да је Наставно-научно веће Универзитета у Београду-Биолошког факултета, на седници одржаној 14. 6. 2024. год. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем.
2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације.
3. 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

50/129 - 14. 6. 2024.

На основу члана 96. Закона о високом образовању, члана 62. став 1. тачка 12. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета и члана 29. Правилника о докторским студијама на Универзитету у Београду-Биолошком факултету, бр: 15/276 од 07.09.2018; 15/122 од 14.06.2019.; 15/132 од 11.09.2020. године., Наставно-научно веће Факултета, на VIII редовној седници одржаној 14. 6. 2024. године, донело је

О Д Л У К У

о прихватању теме докторске дисертације и одређивању ментора

На основу Извештаја Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације прихвата се тема докторске дисертације и одређује ментор кандидату:

Ивани А. Пашић, мастер биолог, студијског програма докторских студија:
Молекуларна биологија, модул: Молекуларна биомедицина, под називом:

„Антитуморска активност екстраката и изолованих једињења из биљне врсте *Cotinus coggygia Scop.*”

За менторе се одређују:

1. др Ивана Матић, виши научни сарадник, Институт за онкологију и радиологију Србије,
2. др Милош Бркушанин, научни сарадник, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- ментору;
- Стручној служби Факултета

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 13.05.2024. године, одређени смо у Комисију за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације **Иване А. Пашић**, под насловом:

„Антитуморска активност екстраката и изолованих једињења из биљне врсте *Cotinus coggygria Scop.*”.

На основу поднете документације и увида у досадашњи рад **Иване А. Пашић**, Комисија подноси Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографија:

Општи подаци:

Име, средње слово и презиме: Ивана А. Пашић

Датум и место рођења: 14.12.1997., Суботица

Образовање:

2021. – тренутно: докторске академске студије, Универзитет у Београду - Биолошки факултет; студијски програм – Молекуларна биологија, подмодул Молекуларна биомедицина

2020. – 2021. Мастер академске студије, Универзитет у Београду - Биолошки факултет; модул Хумана молекуларна биологија

2016. - 2020. Основне академске студије, Универзитет у Београду - Биолошки факултет; студијски програм Биологија, подмодул Молекуларна биологија

Запослење: Истраживач-приправник, Лабораторија за радиобиологију и експерименталну онкологију, Институт за онкологију и радиологију Србије, Београд

Курсеви: **2024.** Тринаеста школа радиобиологије Обнинск, Русија

2023. Биоинформатичка обрада података добијених РНК секвенцирањем- Сплит, Хрватска- MedILS School in Bioinformatics training

2023. Cost акција, Давос, Швајцарска “3D or not 3D: new solutions to recreate cancer biology *in vitro*” тренинг

2023. Обука на апарату NextSeq 550Dx “TruSight Oncology 500 Training: DNA Workflow”

2023. ЕУТА тренинг на тему “Писање Horizon Europe пројеката”

Пројекти:

2024. -Учесник на пројекту 101158832 „Twinning to increase scientific excellence, sustainable knowledge transfer networking, and research capacity in Serbia in the field of radiobiology” (RadExIORSBoost), Horizon Europe Framework Programme (HORIZON-WIDERA-2023-ACCESS-02 Twinning Bottom-up) (01.10.2024. – 30.09.2027.)

2024. - Програм рада ИОРС-а за 2024. годину

Министарство науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије, 451-03-66/2024-03/200043, учесник

2023. - Програм рада ИОРС-а за 2023. годину

Министарство науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије, 451-03-47/2023-01/200043, учесник

2022. - Програм рада ИОРС-а за 2022. годину

Министарство науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије, 451-03-68/2022-14/ 200043, учесник

Чланство у научним друштвима:

Српско друштво истраживача рака (СДИР)

Европско друштво за истраживање рака (ЕАСР)

Српско друштво за молекуларну биологију (MolBioS)

Страни језици: енглески и мађарски

Посебне активности и награде:

Стипендија Европског друштва за истраживање рака (ЕАСР) за учешће на годишњој конференцији у Ротердаму, Холандија 2024. EACR 2024 Congress: Innovative Cancer Science

Б. Библиографија:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Preljević K, **Pašić I**, Vlaović M, Matić IZ, Krivokapić S, Petrović N, Stanojković T, Živković V, Perović S. Comparative analysis of chemical profiles, antioxidant, antibacterial, and anticancer effects of essential oils of two *Thymus* species from Montenegro. *Fitoterapia*. 2024; 174:105871. doi: 10.1016/j.fitote.2024.105871. (IF=3.4, M22)

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у целисти

Б4. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу

1. **Pašić I**, Srbijak Ćuk I, Petrović N, Matić I, Džudžević-Čančar H, Dedić A, Alispahić A, Boškailo E, Stanojković T. Cytotoxic Effects of *Lavandula angustifolia* Mill. and *Laurus nobilis*

L. Essential Oils on Human Cervical Adenocarcinoma Cells. "HDIR-6: Targeting Cancer", November 10-12, 2022, Zagreb, Croatia. P10. Poster presentation.

2. **Pasic I**, Matic IZ, Petrovic N, Preljevic K, Stanojkovic Z, Perovic S. Anticancer effects of *Thymus vulgaris* and *Thymus serpyllum* essential oils from Montenegro. EACR 2023 Congress: Innovative Cancer Science, June 12-15, 2023, Torino, Italy, Molecular Oncology, Volume 17, Supplement 1, June 2023, p -125-126, EACR23 P0302. Poster presentation.

3. **Pašić I**, Preljević K, Matić IZ, Petrović N, Stanojković T, Perović S. Exploring the anticancer activity of essential oil of *Satureja montana* L. from Montenegro. SDIR6 congress: "From collaboration to innovation in cancer research", October 02-04, 2023, Belgrade, Serbia, Oncology Insights, p18. Poster and short oral presentation.

B5. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Ivana Pašić**, Ivana Z. Matić, Tatjana Stanojković. Application of radiosensitizers and radioprotectors to increase the efficiency of radiotherapy. 60th Oncology Congress, 29.11-02.12.2023, Belgrade, Serbia.

В. Тема докторске дисертације:

Наслов дисертације:

„Антитуморска активност екстраката и изолованих једињења из биљне врсте *Cotinus coggygia* Scop.”

Полазне основе:

Бројни секундарни метаболити биљака поседују антитуморско дејство *in vitro* и *in vivo*, од којих су најзначајнија следећа биоактивна једињења: алкалоиди, танини, флавоноиди и бројна фенолна једињења (1). Биљни свет представља неисцрпан извор нових једињења и природних производа са потенцијалним антитуморским дејством. Откриће нових биљних екстраката и једињења који би могли да повећавају осетљивост малигнух ћелија на зрачење је од изузетног значаја, јер се радиотерапијом као модалитетом лечења лечи око 50% пацијената оболелих од малигнух болести (2). Радиопротектори би могли да се примењују како би се заштитило нормално околно ткиво од споредних, нежељених ефеката зрачења. Поменута једињења показују значајан потенцијал у заштити нетрансформисаних ћелија од зрачења, али испољавају високу токсичност (3). Многа једињења изолована из биљака су показала радиопротективне ефекте на анималним моделима. Једињења изолована из биљака, попут флавоноида, су антиоксиданси који могу неутралисати штетне реактивне кисеоничне врсте, и морају се применити или пре или током зрачења како би испољили оптималну ефикасност као радиопротектори (3).

У традиционалној кинеској медицини различити делови биљне врсте *Cotinus coggygia* Scop. (руј) су коришћени као локални антипиретици, као и за брже зарастање рана, затим у лечењу хипертензије и срчаних обољења, уринарних инфекција, кашља, дијабетеса и болести јетре. Значајна биолошка и фармаколошка својства биљке руј су антибактеријско, антиоксидативно и цитотоксично дејство (4). Екстракти руја у највећем проценту садрже танине и флавоноиде из скоро свих субкласа флавоноида, који су у претходним

истраживањима показали антитуморски потенцијал (4,5,6). Резултати *in vitro* истраживања флавоноида из метиленхлоридно-метанолног екстракта биљке руј из Србије су показали ефекат смањења оштећења ДНК у хуманим лимфоцитима (7). У локалној народној медицини југозападне Румуније и Бугарске користе се различити делови биљке; младе гране и листови кувани у води служе као традиционални лек за упале грла, стоматитис, гастритис и гингивитис (8,9). У српској народној медицини рак се лечио и тинктуром спремљеном од коре руја (10). Флавоноиди, фенолне киселине и стероли су главни конституенти екстракта руја и они су у претходним литературним подацима показали цитотоксично дејство (4).

Предмет докторске дисертације

Предмет истраживања докторске дисертације је испитивање антитуморског дејства *in vitro* екстракта и једињења изолованих из биљне врсте руј, који би могли да испоље значајан антитуморски потенцијал и већу селективност у свом дејству према малигним ћелијама, односно мању токсичност према неизмењеним ћелијама. Биљни екстракти и једињења који су детаљно окарактерисани *in vitro* у свом дејству према малигним ћелијама и имају високу селективност у антитуморском дејству, имају потенцијал да се даље испитују у *in vivo* тестирањима као хемиопревентивни агенси и/или комплементарни антитуморски агенси. Од дрвенастог дела биљне врсте руј припремљена су три екстракта: метиленхлорид/метанолни екстракт (1:1), етанолни екстракт и водени екстракт. Водени екстракт представља екстракт добијен као чај, етанолни екстракт представља екстракт добијен као тинктура, а метиленхлорид/метанолни је екстракт широког опсега поларности, па је он додатно изабран за испитивање, јер су водени и етанолни екстракти много поларнији. Из етанолног екстракта руја изоловано је дванаест главних једињења: сулфуретин, фустин, ериодиктиол, таксифолин, бутин, бутеин, фисетин, котинигнан А, сулфуретин ауронол, 3-О-метилеифустин, 3-О-метилфустин и ситостерол-3-О-глукозид. Два изолована једињења, 3-О-метилеифустин и сулфуретин ауронол, су у овом истраживању први пут изоловани из биљке руј.

Научни циљ истраживања

Основни циљ истраживања у оквиру докторске дисертације је да се испитају механизми антитуморског дејства екстракта и једињења биљне врсте руј, *Cotinus coggygria* Scop.

Основни циљ докторске дисертације биће остварен кроз следеће специфичне циљеве:

1. Испитати интензитет цитотоксичног дејства три екстракта добијена од биљке руј (метиленхлорид/метанолни (1:1), етанолни и водени екстракт) и дванаест изолованих једињења (сулфуретин, фустин, ериодиктиол, таксифолин, бутин, бутеин, фисетин, котинигнан А, сулфуретин ауронол, 3-О-метилеифустин, 3-О-метилфустин и ситостерол-3-О-глукозид) према низу хуманих малигних ћелијских линија: аденокарцином цервикса HeLa, меланом А375, мијелоидна леукемија K562, акутна промијелоцитна леукемија HL-60, аденокарцином простате PC-3, карцином простате DU 145, аденокарцином дојке MDA-MB-231, према неизмењеним хуманим фибробластима плућа MRC-5 и кератиноцитима HaCaT, као и према 3Д моделима (вишећелијским туморским сфероидима) HeLa и MDA-MB-231 малигних ћелија.

2. Испитати механизме цитотоксичног дејства три екстракта и одабраних једињења која испољавају највећу цитотоксичност, на две малигне ћелијске линије: аденокарцином цервикса HeLa и мијелоидна леукемија K562, одређивањем ефекта на расподелу ћелија у

фазама ћелијског циклуса и утврђивањем типа ћелијске смрти.

3. Испитати *in vitro* анти-инвазивно дејство три екстракта и одабраних једињења која испољавају највећу цитотоксичност на хуманим малигним HeLa ћелијама одређивањем ефекта на миграцију ћелија *in vitro* и одређивањем експресије гена који кодирају матриксну металопроотеиназу 2 (MMP2), матриксну металопроотеиназу 9 (MMP9) и васкуларни ендотелски фактор раста A (VEGFA).

4. Испитати ефекат одабраног једињења руја на различите сигналне путеве у хуманим малигним ћелијама мијелоидне левкемије K562 у циљу разјашњавања механизма антитуморског дејства једињења одређивањем диференцијално експримираних гена у односу на контролне, нетретирание ћелије.

5. Испитати генотоксични и антиоксидативни ефекат три екстракта и одабраних једињења која испољавају највећу цитотоксичну активност на неизмењеним хуманим фибробластима плућа MRC-5.

6. Испитати ефекат екстраката и једињења руја на осетљивост хуманих малигнућ ћелија аденокарцинома дојке MDA-MB-231 и неизмењених хуманих фибробласта плућа MRC-5 на зрачење, а затим и испитати механизме радиомодулаторног дејства екстраката и једињења руја који покажу радиомодулаторни ефекат одређивањем дистрибуције ћелија у одређеним фазама ћелијског циклуса, степена апоптозе и интензитета оштећења ДНК у ћелијама.

Материјал и методе који се користе

1. Биљни материјал биљне врсте руј је сакупљен у Делиблатској пешчари у Војводини у јулу 2018. године. Проф. Милан Вељић са Биолошког факултета Универзитета у Београду је идентификовао биљни материјал и узорковани примерак је депонован у хербаријуму Института за ботанику Биолошког факултета и Ботаничке баште “Јевремовац” у Београду, Србија (ваучер број ВЕОУ 17422). Из етанолног екстракта су изолована једињења применом колонске хроматографије и семипрепаративног HPLC-а (eng. High performance liquid chromatography). Структура једињења је окарактерисана применом 1Д и 2Д нуклеарно магнетне резонантне спектроскопије (NMR), инфрацрвене и ултраљубичасте спектроскопије и полариметрије. Др Мирослав Новаковић, виши научни сарадник Института за хемију, технологију и металургију, Универзитета у Београду - Института од националног значаја за Републику Србију, је припремио екстракте, изоловао и хемијски окарактерисао једињења руја.

2. Интензитет цитотоксичне активности екстраката и једињења руја ће бити одређен на седам хуманих малигнућ ћелијских линија (HeLa, A375, K562, HL-60, PC-3, DU 145, MDA-MB-231) и две хумане неизмењене ћелијске линије (MRC-5 и HaCaT) колориметријским микротетразолијум (МТТ) тестом након 72 сата инкубације. Интензитет цитотоксичне активности екстраката и једињења према 3D сфероидима HeLa и MDA-MB-231 ћелија ће бити одређен бојењем ћелија флуоресцентном бојом калцеин ацетоксиметилестар.

3. Испитивање механизма цитотоксичног дејства

Након 24 и 48 сати инкубације HeLa и K562 ћелија у присуству екстраката и одабраних једињења руја проточном цитометријом ће бити одређен проценат ћелија у субГ1, Г1, С и Г2/М фазама ћелијског циклуса. Испитивање типа ћелијске смрти: HeLa и K562 ћелије ће бити третиране екстрактима и једињењима руја и биће обојене анексин V-FITC и пропиридијум јодидом. Проточном цитометријом ће бити одређени проценти живих ћелија и

ћелија у раној и касној фази апоптозе и/или некрозе. Испитивање циљних каспаза: HeLa и K562 ћелије ће бити претретиране специфичним инхибиторима каспаза (Z-DEVD-FMK-инхибитор каспазе 3, Z-IETD-FMK - инхибитор каспазе 8 и Z-LEHD-FMK - инхибитор каспазе 9), затим третиране екстрактима и једињењима руја током 24 часа. Проточном цитометријом ће бити одређен проценат ћелија у субG1 фази ћелијског циклуса.

4. Испитивање утицаја екстраката и једињења руја на миграцију HeLa ћелија ће бити испитано применом *in vitro* “scratch” есеја, познатог и као “wound healing” есеј након 24 и 48 сати инкубације. Ефекат екстраката и једињења на експресију гена који кодирају матриксну металопроотеиназу 2 (MMP2), матриксну металопроотеиназу 9 (MMP9) и васкуларни ендотелски фактор раста А (VEGFA) ће бити одређен у HeLa ћелијама након 24 сата инкубације применом квантитативног PCR-а у реалном времену и TaqMan® есеја.

5. Испитаће се ефекат одабраног једињења руја на промене транскриптома у хуманим ћелијама хроничне мијелоидне леукемије K562 применом секвенцирања информационе РНК. Биоинформатичком анализом промена профила генске експресије у третираним ћелијама у односу на контролне ћелије идентификоваће се сигнални путеви преко којих испитивано једињење делује и расветлиће се механизми његовог антитуморског дејства. Биоинформатичка и биостатистичка анализа података добијеним секвенцирањем РНК ће се вршити у R програму у сарадњи са колегама са Медицинског факултета у Манхајму, Универзитета у Хајделбергу. Анализа контроле квалитета сирових података и контроле квалитета података након иницијалне обраде и чишћења ће се радити применом FastQC. Чишћење сирових података биће обављено у софтверу Trimmomatic. Поравнање РНАсек података биће изведено у Kallisto програму. Уклањање гена са глобално ниским експресијама биће обављено у EdgeR пакету у R програмском језику. Функција voom из пакета limma у R-у биће коришћена за нормализацију података и log2 трансформацију. Анализа диференцијално експримираних гена такође ће бити изведена коришћењем пакета limma у R-у. Анализа сигналних путева биће изведена коришћењем пакета ReactomePA у R-у, употребом Reactome базе података и у пакету fgsea, користећи KEGG базу података, такође у R-у.

6. Испитивање генотоксичног ефекта. Интензитет оштећења ДНК у хуманим фибробластима плућа MRC-5 након третмана током 24 сата субтоксичним концентрацијама екстраката и једињења ће бити одређен комет есејом. Анализа ће се радити на слајдовима са 12 минигелова у хоризонталном систему за електрофорезу за 20 слајдова. ДНК ће бити обојена SYBR gold флуоресцентном бојом. Комете ће бити анализирани под флуоресцентним микроскопом применом софтвера Comet Assay IV.

7. Испитивање нивоа унутарћелијских реактивних кисеоничних врста. Хумани фибробласти плућа MRC-5 ће бити третиран субтоксичним концентрацијама екстраката и једињења током 24 сата. Ћелије ће након инкубације бити обојене 2',7' дихлородихидрофлуоресцеин диацетатом. Одређиваће се ниво оксидативног стреса у ћелијама на основу интензитета флуоресценције флуоресцентне боје проточном цитометријом. У циљу утврђивања цитопротективног дејства ћелије ће бити изложене кратком третману водоник пероксидом и ниво оксидативног стреса у ћелијама ће се одређивати на основу интензитета флуоресценције флуоресцентне боје проточном цитометријом.

8. Испитивање радиомодулаторног дејства. Комбиновани ефекат екстраката и једињења руја и зрачења у дози од 2 и/или 8 Gy на ћелије аденокарцинома дојке MDA-MB-231 и нормалне фибробласте плућа MRC-5 ће бити испитан колориметријским МТТ тестом

и/или клоногеним тестом након 72 сата инкубације или вишедневне инкубације (клоногени тест). Затим ће се испитати и комбиновани ефекат зрачења и екстраката и једињења на дистрибуцију ћелија по фазама ћелијског циклуса и степен апоптозе проточном цитометријом, док ће интензитет оштећења ДНК бити одређен комет есејом.

9. За статистичку анализу добијених података користиће се параметријски, односно непараметријски статистички тестови у зависности од нормалности расподеле података (Студентов т-тест или Mann-Whitney тест).

Очекивани резултати и научни допринос

Резултати истраживања у оквиру докторске дисертације довешће до нових сазнања о интензитету цитотоксичног дејства етанолног, воденог и метилен-хлорид/метанолног екстракта (1:1) и једињења изолованих из руја (сулфуретин, фустин, ериодиктиол, таксифолин, бутин, бутеин, фисетин, котинигнан А, сулфуретин ауронол, 3-О-метилепифустин, 3-О-метилфустин и ситостерол-3-О-глукозид). Ефекат екстраката и одабраних једињења на учесталост малигнућ ћелија у фазама ћелијског циклуса, као и тип ћелијске смрти, расветлиће механизме њиховог цитотоксичног дејства. Селективност у антитуморском дејству према малигним у односу на неизмењене ћелије и активација ћелијске смрти по типу апоптозе указаће на екстракте и једињења који поседују најзначајнији антитуморски потенцијал. Идентификација диференцијално експримираних гена у малигним ћелијама које су третиране одабраним једињењем руја допринеће карактеризацији механизма његовог антитуморског дејства. Податак да испитивани екстракти и једињења руја имају инхибиторни ефекат на миграцију малигнућ ћелија *in vitro*, поред показане цитотоксичности, био би од значаја за њихову антитуморску ефикасност због истовременог дејства на више својстава малигну трансформисане ћелије. Резултати о антиоксидативном и цитопротективном дејству екстраката и једињења изолованих из руја могли би да имају значајне импликације за развој терапијских стратегија усмерених на третман оксидативног стреса. Уколико екстракти и једињења не испољавају значајну генотоксичност према неизмењеним ћелијама, тај податак додатно указује на њихов антитуморски потенцијал. Очекује се да ће ова истраживања довести до нових сазнања у литератури о ефектима екстраката и једињења руја на осетљивост малигнућ ћелија на зрачење. Уколико би екстракти или једињења руја повећавали ефекат зрачења на малигнућ ћелије овај резултат би могао да доведе до открића нових природних радиосензитизера, односно радиопротектора уколико би смањивали ефекат зрачења на неизмењене ћелије.

Најважнији литературни подаци који подржавају тему (до 10 референци)

1. Georgiev V, Ananga A, Tsoleva V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*. 2014; 6(1):391-415. doi: 10.3390/nu6010391.
2. Komorowska D, Radzik T, Kalenik S, Rodacka A. Natural Radiosensitizers in Radiotherapy: Cancer Treatment by Combining Ionizing Radiation with Resveratrol. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(18):10627. doi: 10.3390/ijms231810627.
3. Kuruba V, Gollapalli P. Natural radioprotectors and their impact on cancer drug discovery. *Radiat Oncol J*. 2018; 36(4):265-275. doi: 10.3857/roj.2018.00381.
4. Matić S, Stanić S, Mihailović M, Bogojević D. *Cotinus coggygria* Scop.: An overview of its chemical constituents, pharmacological and toxicological potential. *Saudi J Biol Sci*. 2016; 23(4):452-61. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.05.012.

5. Gospodinova ZI, Zupkó I, Bózsity N, Manova VI, Georgieva MS, Todinova SJ, Taneva SG, Ocsovszki I, Krasteva ME. *Cotinus coggygia* Scop. induces cell cycle arrest, apoptosis, genotoxic effects, thermodynamic and epigenetic events in MCF7 breast cancer cells. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2020; 76(3-4):129-140. doi: 10.1515/znc-2020-0087.
6. Wang G, Wang J, Du L, Li F. Effect and Mechanism of Total Flavonoids Extracted from *Cotinus coggygia* against Glioblastoma Cancer *In Vitro* and *In Vivo*. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:856349. doi: 10.1155/2015/856349.
7. Milosavljevic S, Djordjevic I, Mandic B, Tesevic V, Stankovic M, Todorovic N, Novakovic M. Flavonoids of the Heartwood of *Cotinus coggygia* Scop. Showing Protective Effect on Human Lymphocyte DNA. *Nat Prod Commun.* 2021;16(12). doi:10.1177/1934578X211067289
8. Antal DS, Ardelean F, Jijie R, Pinzaru I, Soica C, Dehelean C. Integrating Ethnobotany, Phytochemistry, and Pharmacology of *Cotinus coggygia* and *Toxicodendron vernicifluum*: What Predictions can be Made for the European Smoketree? *Front Pharmacol.* 2021;12:662852. doi: 10.3389/fphar.2021.662852.
9. Ivanova D, Pavlov D, Eftimov M, Kalchev K, Nashar M, Tzaneva M, Valcheva-Kuzmanova S. Subchronic toxicity study of ethanol infusion from *Cotinus coggygia* wood in rats. *Bulg J Agric Sci.* 2013; 19: 182-185.
10. Demirci B, Demirci F, Başer KHC. Composition of the essential oil of *Cotinus coggygia* Scop. from Turkey. *Flavour Fragr J.* 2003; 18 (1): 43–44. doi:10.1002/ffj.1149

Г. Закључак и предлог:

На основу увида у приложену документацију, Комисија закључује да је тема докторске дисертације кандидаткиње **Иване А. Пашић** научно релевантна, да су предмет и циљеви истраживања научно утемељени и адекватно поткрепљени претходним истраживањима, те да су у потпуности оствариви кроз предложени експериментални рад. Актуелност и значај предложене теме, као и експериментални приступ испуњавају научне захтеве докторске дисертације. Резултати истраживања у оквиру докторске дисертације даће значајни научни допринос области којој тема припада и могу да доведу до нових сазнања о механизмима антитуморског дејства *in vitro* три екстракта добијена од дрвенастог дела биљне врсте руј и изолованих једињења из етанолног екстракта дрвенастог дела руја, као и до нових података о њиховом могућем радиомодулаторном дејству. Добијени резултати могу да допринесу расветљавању антитуморског потенцијала екстраката и једињења руја, потврду досадашњих етнофармаколошких сазнања о примени руја, и пруже даљу основу за испитивање њихове антитуморске ефикасности и могућу примену у превенцији и терапији малигних болести.

Комисија закључује да је тема докторске дисертације **Иване А. Пашић**, под насловом „**Антитуморска активност екстраката и изолованих једињења из биљне врсте *Cotinus coggygia Scop.***” у потпуности научно заснована, као и да кандидаткиња својим досадашњим експерименталним радом и теоријским знањем задовољава све услове за успешну реализацију предложеног истраживања. На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета да прихвати ову тему и одобри израду предложене докторске дисертације. Комисија предлаже за менторе др Ивану Матић, вишег научног сарадника Института за онкологију и радиологију Србије и др Милоша Бркушанина, научног сарадника Универзитета у Београду - Биолошки факултет.

Београд, 22.05.2024. године

Комисија:

др Милош Бркушанин, научни сарадник
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Ивана Матић, виши научни сарадник,
Институт за онкологију и радиологију Србије

др Мирослав Новаковић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду-Институт за хемију, технологију и металургију