

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На VII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 14.05.2021. године, на основу молбе ментора, др Гордане Шупић, ванредни професор, Универзитет одбране – Медицински факултет Војномедицинске академије и др Катарине Зељић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Бојане М. Узелац** (рођена Милићевић), истраживач приправник, Институт за медицинска истраживања Војномедицинске академије, под насловом: „**Прогностички значај експресије гена за хистон-деацетилазе код пацијенткиња са троструко-негативним и хормон рецептор-позитивним карциномом дојке**“, у саставу: др Гордана Шупић, ванредни професор, Универзитет одбране – Медицински факултет Војномедицинске академије, др Катарина Зељић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Ана Кривокућа, виши научни сарадник, Институт за онкологију и радиологију Србије.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Веће научних области природних наука је на седници одржаној 31.10.2019. године донело одлуку да даје сагласност на предлог теме докторске дисертације Бојане М. Узелац (рођена Милићевић) под насловом: „Прогностички значај експресије гена за хистон-деацетилазе код пацијенткиња са троструко-негативним и хормон рецептор-позитивним карциномом дојке“.

Докторска дисертација Бојане М. Узелац је реализована на Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду. Биолошки узорци су добијени у сарадњи са Институтом за онкологију и радиологију Србије.

Докторска дисертација је написана на 99 страна, у потпуности уређена према упутству за техничко обликовање докторских дисертација на Универзитету у Београду. Теза садржи све неопходне делове: насловну страну на српском и енглеском језику, податке о менторима и одређеној комисији, сажетак на српском и енглеском језику (2 стране), листу скраћеница (2 стране), садржај (2 стране), увод (22 стране: стр. 1-22), циљеве рада (1 страна: стр. 23), материјал и методе (8 страна: стр. 24-32), резултате (23

странице: стр. 33-56), дискусија (10 страна: стр. 57-67), закључци (1 страна: стр. 68), литература (14 страна: стр. 69-83), биографија аутора (1 страна), изјава о ауторству (1 страна), изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада (1 страна) и изјава о коришћењу (2 стране). У оквиру докторске дисертације се налази 24 слике. Слике које су преузете и модификоване у уводу су правилно цитиране према основном извору за који је рађена модификација. Дисертација садржи укупно 9 табела. У попису литературе се налази 215 цитираних литературних јединица.

Анализа докторске дисертације

Кандидаткиња Бојана М. Узелац се у докторској дисертацији бавила испитивањем релативне експресије пет гена за хистон-деацетилазе из две различите класе (хистон-деацетилазе класе II и класе III - сиртуина) у туморским узорцима пацијенткиња са дијагностикованим троструко-негативним и хормон рецептор-позитивним карциномом дојке.

У **уводу**, у делу *Карцином дојке* (стр. 1-6), кандидаткиња даје најважније информације о карциному дојке, епидемиологији овог малигнитета, факторима ризика и класификацији болести, укључујући TNM (енг. *Tumour – Node – Metastasis*) класификацију. Посебан аспект уводног дела је посвећен различитим молекуларним типовима карцинома дојке и то: троструко-негативном и хормон рецептор-позитивном карциному дојке, при чему је наглашен значај разлика које постоје између ових молекуларних типова. Троструко-негативан карцином дојке (енг. *Triple Negative Breast Cancer* - TNBC) је дефинисан одсуством рецептора за естроген, прогестерон и рецептор за хумани епидермални фактор раста-2 (ER-PR-HER2-). Заступљеност овог типа карцинома је 12-17% међу свим молекуларним типовима. Хормон рецептор-позитиван карцином дојке има експримиране хормонске рецепторе за прогестерон и естроген. Молекуларни тип ког карактерише присуство рецептора за прогестерон и естроген, као и одсуство рецептора за хумани епидермални фактор раста-2 (ER+PR+HER2-) је најзаступљенији, са учесталošћу око 80%. Наглашено је да се два наведена молекуларна типа карцинома дојке разликују по степену агресивности и прогнози болести, при чему пацијенти са троструко-негативним карциномом дојке имају значајно лошије преживљавање. Ипак, молекуларно-генетичка основа уочених разлика није у потпуности расветљена и поред генетичких узрока може укључити и епигенетичке промене. У посебном делу увода, насловљеном *Епигенетика канцера* (стр. 6-10), докторанткиња даје јасна објашњења о епигенетичким модификацијама и њиховом значају у комплексном процесу канцерогенезе. Дате су основне информације о епигенетичким механизмима и то: ДНК метилацији, модификацији хистона и некодирајућим РНК молекулима. У делу који се тичао модификације хистона је дат посебан осврт на ацетилацију хистона. У наставку уводног дела, под насловом *Хистон-деацетилазе* (стр. 10-22), обрађене су хистон-деацетилазе (енг. *Histon Deacetylase* - HDAC), ензими који имају кључну улогу у уклањању ацетил

група са лизинских остатака хистона. Објашњена је подела хистон-деацетилаза у класе према њиховој ћелијској локализацији, биолошкој функцији и хомологији са хистон-деацетилазама квасца. Наведено је да у класу I спадају HDAC1, 2, 3 и 8, класу II: HDAC4, 5, 6, 7, 9 и 10, класу III никотинамид аденин динуклеотид зависне хистон-деацетилазе које се још називају сиртуини, где спадају SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 и IV класу коју чини HDAC11. Кандидаткиња је указала да је за различите малигнитете карактеристична аберантна експресија хистон-деацетилаза. Навела је потенцијале и ограничења коришћења инхибитора хистон-деацетилаза у третману солидних тумора. У одвојеним потпоглављима је разматрана улога хистон-деацетилаза у канцеру, а посебно HDAC7 и класа сиртуина, конкретно SIRT1, SIRT3, SIRT6 и SIRT7. Дат је врло детаљан и исцрпан приказ улоге сваког од наведених појединачних гена и ензима које кодирају у канцеру, а који су били од посебног значаја за тематику ове докторске дисертације.

Општи **циљ** докторске дисертације је било испитивање експресије гена за II и III класу хистон-деацетилаза у два различита типа карцинома дојке, троструко-негативним и хормон рецептор-позитивним, као и испитивање значаја гена за II и III класу хистон-деацетилаза као потенцијалних прогностичких молекуларних биомаркера. Ужи циљеви докторске дисертације су јасно и таксативно наведени. Циљеви тезе су били следећи:

1. Анализирати релативни ниво експресије гена за III класу (*SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7*) и II класу (*HDAC7*) хистон-деацетилаза у групи пацијенткиња са TNBC и хормон рецептор-позитивним карциномом дојке;
2. Испитати постојање разлике у нивоу експресије *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7* и *HDAC7* гена између различитих молекуларних типова карцинома дојке;
3. Анализирати повезаност експресије *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7* и *HDAC7* гена са клиничко-патолошким карактеристикама пацијенткиња: хистолошким типом, нуклеусним и хистолошким градусом, величином тумора, нодалним статусом и присуством метастаза;
4. Испитати повезаност експресије *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7* и *HDAC7* гена са преживљавањем пацијенткиња са карциномом дојке и ризиком за негативни исход укупног преживљавања.

У делу **Материјал и методе**, поднаслов *Материјал* (стр. 24-25), наведене су одлике студијске групе. Студијску групу је чинило укупно 135 пацијенткиња са дијагностикованим карциномом дојке. Од тога, 61 (45%) пацијенткиња је имала постављену дијагнозу троструко-негативног, а 74 (55%) хормон рецептор-позитивног HER2- типа карцинома дојке. Кандидаткиња је навела и под којим условима су прикупљани и чувани биолошки узорци, наглашавајући сагласност коришћења истих са етичким стандардима прописаним оригиналном верзијом Декларације из Хелсинкија и њеним каснијим амандманима. Клиничко-патолошке одлике испитаница укључених у студију су приказане табеларно. У *Методама* (стр. 25-32) су дати адекватни описи процедура које су коришћене при извођењу неопходних експеримената за реализацију постављених циљева. У седам мањих логички одвојених поднастова, објашњени су извођени поступци

изолације и одређивање концентрације укупне РНК, реверзна транскрипција и ланчана реакција полимеразе, електрофореза на агарозном гелу и квантитативни PCR. У последњем потпоглављу су наведени сви коришћени статистички тестови са одговарајућим објашњењима.

Резултати докторске дисертације се могу поделити на три целине. У првој (стр. 33-39) су приказани резултати релативне експресије за све анализиране гене у узорцима ткива троструко-негативног и хормон рецептор-позитивног карцинома дојке. Други део резултата (стр. 40-49) се односи на испитивање повезаности експресије гена хистон-деацетилаза и сиртуина и клиничко-патолошких одлика пацијенткиња. Трећи део резултата (стр. 50-56) се односи на испитивање прогностичког потенцијала гена од интереса, коришћењем крива преживљавања и спровођењем униваријантне и мултиваријантне регресионе анализе ризика. Сва три дела резултата су одвојена у по пет целина одвојених поднасловима који одговарају испитиваним генима и анализи која је рађена.

У првом делу резултата, на пет слика у виду хистограма, представљени су релативни нивои експресије испитиваних *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7* и *HDAC7* гена између два различита молекуларна типа карцинома дојке. Процентуална заступљеност пацијенткиња са сниженим и повишеним нивоом експресије анализираних гена је такође представљена на пет слика у виду пита-графикона. Резултати докторске дисертације Бојане М. Узелац показују да је између пацијенткиња са троструко-негативним и хормон рецептор-позитивним карциномом дојке експресија *SIRT1*, *SIRT3* и *HDAC7* гена значајно нижа у узорцима пацијенткиња са TNBC типом карцинома дојке. Овакви налази указују да између различитих молекуларних типова карцинома дојке постоје различити профили експресије гена за хистон-деацетилазе, и то сиртуине *SIRT1*, *SIRT3* и хистон-деацетилазе II класе, *HDAC7*.

У другом делу резултата, подаци су организовани у пет табела. Разматрана је асоцијација експресије *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*, *SIRT7* и *HDAC7* гена са хистолошким типом (дуктални, лобуларни и други), старошћу (према медијани година), менопаузом, величином тумора, хистолошким градусом, нуклеусним градусом, нодалним статусом и присуством метастаза. Утврђено је постојање значајне повезаности снижене експресије *SIRT1* гена са већом величином тумора код пацијенткиња са ER+PR+HER2- типом карцинома дојке. Код TNBC пацијенткиња је утврђено да постоји повезаност повећане експресије *SIRT3* гена и већег хистолошког градуса тумора датих пацијенткиња. Уочена је и тенденција повезаности повећане експресије *SIRT3* гена и вишег нуклеусног градуса тумора. У групи ER+PR+HER2-, пацијенткиње са лобуларним хистолошким типом карцинома дојке су имале значајно нижу експресију *SIRT3* гена у односу на остале хистолошке типове. Код исте групе пацијенткиња је уочена снижена *SIRT3* експресије код пацијенткиња млађих од 60 година, мада је уочен тренд повезаности, без статистичке значајности. У групи пацијенткиња са TNBC типом карцинома дојке постоји значајна повезаност смањене *SIRT7* експресије и величине тумора од 2 до 5cm, док код тумора који су мањи од 2cm и већи од 5cm, постоји повезаност са

повећаном експресијом *SIRT7* гена. Није уочено постојање значајне асоцијације између клиничко-патолошких одлика пацијенткиња и експресије *SIRT6* и *HDAC7* гена.

У трећем делу резултата, подаци су представљени на пет слика и две табеле у оквиру пет одвојених мањих целина. За сваки испитивани ген у докторској дисертацији је рађена анализа повезаности експресије и укупног преживљавања пацијенткиња са троструко-негативним и хормон рецептор-позитивним карциномом дојке. Резултати анализе преживљавања су представљени на сликама у виду Каплан-Мајерових (енг. *Kaplan-Meier*) крива преживљавања. Код пацијенткиња са троструко-негативним карциномом дојке постоји тенденција лошег преживљавања у случају повећане *SIRT1* експресије. Код испитаница са ER+PR+HER2- типом карцинома дојке, показано је да постоји повезаност снижене експресије *SIRT1* гена и лошег преживљавања пацијенткиња. Испитивањем повезаности *SIRT3* генске експресије са укупним преживљавањем пацијенткиња са TNBC и ER+PR+HER2- негативним типом карцинома дојке, утврђено је да у случају повећане *SIRT3* експресије пацијенткиње са TNBC типом имају лошије преживљавање. Уочена је значајна повезаност снижене *SIRT6* експресије и лошег преживљавања пацијенткиња са ER+PR+HER2- карциномом дојке. Показано је да је повећана *SIRT7* експресија асоцирана са лошим преживљавањем код обе групе испитиваних пацијенткиња. У случају TNBC пацијенткиња, величина тумора, метастазе, рецидив и повећана *HDAC7* експресија, представљају факторе ризика лошег преживљавања. Код ER+PR+HER2- смањена *SIRT1* експресија представља ризик за лоше преживљавање испитаница са овим типом карцинома дојке. Утврђено је да појава рецидива и повећана *HDAC7* експресија представљају независне прогностичке параметре лошег преживљавања пацијенткиња са троструко-негативним карциномом дојке. Код ER+PR+HER2- пацијенткиња смањена *SIRT1* експресија представља независни прогностички параметар преживљавања.

Дискусија је подељена у пет целина које су насловљене тако да одговарају генима од интереса проучаваних у докторској дисертацији. У дискусији су добијени резултати у оквиру докторске дисертације сагледани кроз призму актуелних раније публикованих података у разматраној научној области. Кандидаткиња се кроз дискусију није ограничавала само на податке добијене у карциному дојке, већ и у другим малигнитетима, тиме проширујући слику анализираних гена за хистон-деацетилазе у процесу канцерогенезе уопште. Дат је детаљан и критички осврт при тумачењу улоге свих анализираних гена у два различита молекуларна типа карцинома дојке. Кроз презентовану дискусију, уочава се способност кандидаткиње да објективно и критички размотри податке из литературе и кроз исте понуди потенцијална објашњења за резултате које је добила реализацијом своје докторске дисертације.

Из изведених експеримената и резултата докторске дисертације, изведени су закључци које је кандидаткиња навела у јасној и таксативној форми. **Закључци** ове докторске дисертације су били следећи:

- Код пацијенткиња са TNBC типом карцинома дојке, уочен је мањи ниво експресије *SIRT1*, *SIRT3* и *HDAC7* гена у односу на пацијенткиње са ER+PR+HER2- типом. Различит експресиони профил ових гена указује на могуће различите улоге *SIRT1*, *SIRT3* и *HDAC7* у различитим типовима карцинома дојке.
- Није утврђена разлика у нивоу експресије *SIRT6* и *SIRT7* између две испитиване групе пацијенткиња са карциномом дојке.
- Уочена је повезаност повећане *SIRT1* експресије и мање величине тумора код пацијенткиња са ER+PR+HER2- карциномом дојке, што сугерише на протективну улогу *SIRT1* код овог типа карцинома дојке.
- Код TNBC пацијенткиња, повећана *SIRT3* експресија је повезана са већим хистолошким градусом ових пацијенткиња, што упућује на негативан ефекат *SIRT3* на процес дедиференцијације туморских ћелија овог типа карцинома дојке.
- Уочена је повезаност повећане *SIRT7* експресије и величине тумора код пацијената са TNBC карциномом дојке. Ови резултати указују на улогу *SIRT7* у процесу пролиферације туморских ћелија.
- Каплан-Мајер анализа је показала повезаност снижене *SIRT1* експресије и лошег преживљавања пацијенткиња са ER+PR+HER2- карциномом дојке. Снижен ниво *SIRT1* експресије представља негативан прогностички фактор лошег преживљавања ових пацијенткиња, указујући на потенцијалну тумор-супресорску улогу *SIRT1* у овом типу карцинома дојке.
- Показана је повезаност повећане *SIRT3* експресије и лошег преживљавања пацијенткиња са TNBC карциномом дојке, сугеришући онкогену улогу *SIRT3* у овом типу карцинома дојке.
- Уочена је повезаност снижене *SIRT6* експресије и лошег преживљавања пацијенткиња са ER+PR+HER2- карциномом дојке, указујући на потенцијално тумор-супресорски потенцијал *SIRT6* у овом типу карцинома дојке.
- Код обе испитиване групе пацијенткиња је показана повезаност повећане *SIRT7* експресије и лошег укупног преживљавања ових пацијенткиња, имплицирајући онкогену улогу *SIRT7* у овим типовима карцинома дојке.
- Код TNBC пацијенткиња показана је повезаност повећане *HDAC7* експресије и лошег укупног преживљавања ових пацијенткиња. Повећана *HDAC7* експресије представља негативан прогностички параметар лошег преживљавања ових пацијенткиња. Резултат указује на онкогени потенцијал *HDAC7* у TNBC типу карцинома дојке.
- Код ER+PR+HER2- пацијенткиња смањена *SIRT1* експресија представља независан предиктивни фактор негативног клиничког исхода ових пацијенткиња.
- Код TNBC пацијенткиња повећана *HDAC7* експресија представља независан предиктивни фактор негативног клиничког исхода ових пацијенткиња.

Кроз текст докторске дисертације, кандидаткиња Бојана М. Узелац користи бројне литературне изворе који су савремени и релевантни за проблематику којом се бавила. Попис литературе у тексту је дат бројевима који одговарају нумерисаној листи у делу Литература. Сви коришћени извори су уједначеног стила.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

Uzelac B, Krivokuca A, Brankovic-Magic M, Magic Z, Susnjar S, Milovanovic Z, Supic G. Expression of SIRT1, SIRT3 and SIRT6 Genes for Predicting Survival in Triple-Negative and Hormone Receptor-Positive Subtypes of Breast Cancer. *Pathology & Oncology Research* 2020;26(4):2723-31. IF₂₀₁₉=2,826 **M₂₂**

линк ка публикацији на интернету: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32681437/>

2. **Uzelac B**, Krivokuca A, Susnjar S, Milovanovic Z, Supic G. Histone Deacetylase 7 Gene Overexpression is Associated with Poor Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer Patients. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 2021;25(3):227-235. IF₂₀₁₉=1,378 **M₂₃**

линк ка публикацији на интернету: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33734898/>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Milicevic B**, Krivokuca A, Magic Z, Supic G, Jovandic S, Milovanovic Z, Brankovic-Magic M. SIRT3 gene expression implicates its dual nature in triple negative breast cancer. 3rd Congress of the Serbian Association for Cancer Research „Challenges in anticancer research: Translation of knowledge to improve diagnosis and treatment“, 6-7.10.2017. Belgrade, Serbia **M₃₄**

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата **Бојане М. Узелац (рођена Милићевић)** број индекса: Б3040/2012 послата је дана **26.04.2021. године** на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности нам је достављен истог дана.

На основу извршене анализе коришћењем програма iThenticate, утврђен је проценат подударности од 25%. Увидом у Извештај утврђено је подударање са 157 примарних извора. Детаљном анализом добијеног Извештаја и поклапања по сегментима, уочено је да је подударање са једним примарним извором било 2%, десет извора - 1% и у свим другим случајевима мање од 1%. Поклапања су превасходно потицала од уобичајено присутних термина на енглеском језику, дефинисаних скраћеница, библиографских података о коришћеној литератури, општих места и података и уобичајених фраза карактеристичних за тематику докторске дисертације. Поклапање са резултатима који су проистекли из истраживања кандидаткиње, а који су публиковани у два рада у међународним часописима, износио је 1% и потицао је од бројчаних вредности добијених резултата. Уочене подударности су прихватљиве.

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Бојане М. Узелац**, под насловом **”Прогностички значај експресије гена за хистон-деацетилазе код пацијенткиња са троструко-негативним и хормон рецептор-позитивним карциномом дојке“**, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 27.04.2021. године

Ментори

др Гордана Шупић, ванредни професор
Универзитет одбране – Медицински факултет Војномедицинске академије

др Катарина Зељић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидаткиње Бојане М. Узелац, под насловом „Прогностички значај експресије гена за хистон-деацетилазе код пацијенткиња са троструко-негативним и хормон рецептор-позитивним карциномом дојке“ представља оригинални научни рад. Током израде и писања докторске дисертације, кандидаткиња је показала способност и спремност на самостални научно-истраживачки рад, постављање јасних циљева и њихову реализацију и критичко разматрање добијених резултата из којих произилазе адекватни закључци. С обзиром да улога гена који кодирају хистон-деацетилазе у карциному дојке није у потпуности позната, тематика којом се кандидаткиња бавила доприноси и проширује знања у области молекуларне генетике карцинома дојке, превасходно троструко-негативног молекуларног типа који се одликује најлошијом прогнозом, као и хормон рецептор-позитивног карцинома дојке. Свеукупна оцена прегледане докторске дисертације је позитивна.

Резултати проистекли из ове докторске дисертације су публиковани у два међународна часописа (M22 и M23 категорије) и презентовани на једном међународном конгресу. Тиме су испуњени и формални услови неопходни за наредне академске кораке.

Именована Комисија предлаже Наставно-Научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње Бојане М. Узелац под називом „Прогностички значај експресије гена за хистон-деацетилазе код пацијенткиња са троструко-негативним и хормон рецептор-позитивним карциномом дојке“ и тиме омогући кандидаткињи јавну одбрану дисертације.

КОМИСИЈА:

У Београду, 14.05.2021. године

др Гордана Шупић, ванредни професор
Универзитет одбране – Медицински факултет Војномедицинске академије

др Катарина Зељић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Ана Кривокућа, виши научни сарадник
Институт за онкологију и радиологију Србије