

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 19.04.2022. godine, broj 11/V-2/3-GS, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„In silico karakterizacija *miRNK* meta potpisa i validacija odabranih *miRNK* kao potencijalnih prognostičkih biomarkera u oralnom karcinomu“**

kandidata dr Gorana Stojkovića, zaposlenog u Klinici za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, u Beogradu. Mentor je prof. dr Milovan Dimitrijević, a komentor je prof. dr Katarina Zeljić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Nenad Arsović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Nada Tomanović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Milan Petrović, profesor Stomatološkog fakulteta u Beogradu
4. Prof. dr Srboljub Stošić, profesor Medicinskog fakulteta VMA
5. Naučni saradnik dr Ivan Jovanović, Institut za nuklearne nauke „Vinča“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

## IZVEŠTAJ

### A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Gorana Stojkovića napisana je na ukupno 86 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 16 tabela i 37 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je definisano šta je to oralni karcinom, njegovi etiološki i epidemiološki aspekti, patohistološke osobine kao i klinička slika karcinoma usne duplje uz opis limfnih sudova

glave i vrata i puteva širenja tumora. Predstavljena je poslednja TNM klasifikacija tumora usne duplje i detaljno opisane savremene dijagnostičke metode i načini lečenja.

Takođe je predstavljena genetička i epigenetička osnova razvoja oralnog karcinoma, sa posebnim osvrtom na ulogu malih nekodirajućih RNK (miRNK) uz važnost identifikacije novih biomarkera koji bi u budućnosti mogli biti korišćeni u dijagnostičke i prognostičke svrhe. Detaljno je opisana biogeneza i mehanizam regulacije ekspresije ciljnih gena od strane mikroRNK kao i njihov potencijal u korišćenju kao molekularnih biomarkera i terapeutika kod malignih tumora.

**Ciljevi rada** su precizno definisani, jasno i taksativno navedeni. Osnovni opšti cilj doktorske disertacije je bilo utvrđivanje najčešće dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu i ispitivanje njihovog dijagnostičkog i prognostičkog značaja. Specifični ciljevi istraživanja su bili sledeći:

- Sprovođenje meta-analize ranije publikovanih radova u kojima je ispitivana ekspresija miRNK u tkivu oralnog karcinoma i odgovarajućem netumorskom tkivu poreklom od istog pacijenta nekom od visokopropusnih metoda.
- Kreiranje liste (meta potpis) najčešće dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu na osnovu rezultata meta-analize.
- In silico karakterizacija meta potpisa utvrđivanjem statistički značajnih bioloških procesa i molekularnih puteva obogaćenih genima čija je ekspresija regulisana od strane miRNK iz meta potpisa.
- Odabir miRNK za validaciju na kliničkim uzorcima na osnovu njihove uloge utvrđene u prethodnoj in silico analizi.
- Utvrđivanje nivoa ekspresije odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma u tumorskom tkivu i odgovarajućem okolnom netumorskom tkivu poreklom od istog pacijenta.
- Ispitivanje dijagnostičkog i prognostičkog značaja odabranih miRNK kandidata iz meta potpisa.
- Ispitivanje povezanosti ekspresije odabranih miRNK sa demografskim odlikama pacijenata (pol, starost, upotreba alkohola, pušački status, oralna higijena).
- Ispitivanje povezanosti ekspresije odabranih miRNK sa kliničkopatološkim odlikama pacijenata (lokacija primarnog tumora, histološki gradus, stadijum tumora, veličina tumora, nodalni status, prisustvo metastaza, recidiv, smrtni ishod).

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji koja je sprovedena u Klinici za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Detaljno je opisan način uzimanja uzoraka tkiva, njihovo čuvanje i priprema za molekularno genetičke analize. Od ukupno 35 ispitanika koji su dali informisani pristanak i koji su uključeni u studiju su iz istorije bolesti prikupljeni sledeći demografski podaci: pol, godine starosti u momentu postavljanja dijagnoze, konzumacija alkohola (ne pije, umereno, mnogo), pušački status (nepušač, bivši pušač, pušač) i oralna higijena (dobra, loša). Za pacijente uključene u studijsku grupu su prikupljeni kliničkopatološki podaci: mesto primarnog tumora, histološki gradus, TNM stadijum tumora, veličina tumora, nodalni status, prisustvo metastaza, pojava recidiva, terapija (radioterapija, hemioterapija) i preživljavanje u mesecima do smrti od bolesti. Klasifikaciju tumorskog tkiva su radili specijalisti patologije prema uputstvima datim u 8. izdanju vodiča Union for International Cancer Control Staging Manual. Način sprovođenja meta-analize radi utvrđivanja najčešće dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu primenom metode prebrojavanja glasova (engl. vote counting) je detaljno objašnjen. Korišćeni materijal i metode za sprovođenje molekularno-genetičkih analiza, tj. utvrđivanja ekspresije odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma je prezentovan jasno i detaljno.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati. Rezultati su prikazani tabelarno i slikama.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 139 referenci.

## **B) Provera originalnosti doktorske disertacije**

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa “iThenticate” kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije, utvrđeno je podudaranje od 12%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je prevashodno korišćenja uobičajenih fraza karakterističnih za oblast istraživanja, kao i prethodno publikovanih rezultata koji su proistekli iz doktorske disertacije kandidata, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih

disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

### C) Kratak opis postignutih rezultata

Sprovođenjem meta-analize ranije publikovanih studija koje su se bavile identifikacijom dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu je kreirana lista najčešće dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu i nazvana miRNK meta potpis. Prema rezultatima meta-analize, meta potpis najčešće dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu čini 13 miRNK, od toga sedam povišeno (*miR-21-5p*, *miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-31-5p*, *miR-424-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-21-3p*) i pet sniženo eksprimiranih (*miR-139-5p*, *miR-30a-3p*, *miR-375-3p*, *miR-376c-3p*, *miR-30a-5p*). Sve identifikovane miRNK u okviru meta potpisa su okarakterisane *in silico* metodama na osnovu čega je izvršen izbor pet miRNK kandidata za koje je urađena validacija ekspresije na kliničkim uzorcima. Na prikupljenim kliničkim uzorcima od 35 pacijenata sa oralnim karcinomom koji su uključeni u studiju je validirana povišena ekspresija *miR-31-3p*, *miR-135b-5p* i snižena ekspresija *miR-139-5p* i *miR-30a-5p* gena u tkivu oralnog karcinoma u poređenju sa odgovarajućim okolnim netumorskim tkivom. U slučaju *miR-18a-5p* je uočen statistički trend povišene ekspresije u tumorskom tkivu. Kao potencijalni dijagnostički biomarkeri za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva su potvrđena tri miRNK kandidata: povišeno eksprimirana *miR-31-3p*, i sniženo eksprimirane *miR-139-5p* i *miR-30a-5p*. Sve tri navedene miRNK su imale površinu ispod ROC krive (AUC vrednost) značajno višu od referentne, što ukazuje na značaj i dovoljnu moć navedenih miRNK kao dijagnostičkih biomarkera. Za svaki miRNK je određena vrednost specifičnosti i senzitivnosti i granične vrednosti su dobijene na osnovu maksimalnog Youden-ovog indeksa. U slučaju *miR-31-3p* za graničnu vrednost 2,013 relativne ekspresije, senzitivnost analiziranog biomarkera je iznosila 54,3%, a specifičnost 77,1%. Kada je reč o *miR-139-5p*, za graničnu vrednost 2,229 je određena senzitivnost 48,6%, a specifičnost 91,4%, dok za *miR-30a-5p* granična vrednost iznosila 7,069, a određena senzitivnost 54,3 % i specifičnost 77,1%. Najbolji dijagnostički potencijal je imao panel od tri analizirane miRNK, *miR-31-3p*, *miR-139-5p*, *miR-30a-5p*, za koje je senzitivnost iznosila 94,3%, a specifičnost 51,4%. Dobijeni rezultati pokazuju da se *miR-135b-5p* i *miR-18a-5p* ne mogu koristiti kao dijagnostički biomarkeri oralnog karcinoma.

Analizom preuzetih podataka iz baze TCGA (engl. the cancer genome atlas) o ekspresiji odabranih miRNK u oralnom karcinomu je potvrđeno da su odabrani miRNK kandidati, *miR-31-3p*, *miR-135b-5p* i *miR-18a-5p* povišeno eksprimirani u oralnom karcinomu, dok su *miR-139-5p* i *miR-30a-5p* sniženo eksprimirane. ROC analiza urađena na TCGA podacima ukazala je da je svaka pojedinačna miRNK dobar kandidat za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva.

U okviru doktorske disertacije je ispitivano postojanje korelacije relativne ekspresije analiziranih miRNK gena u tkivu oralnog karcinoma. Utvrđeno je postojanje jake pozitivne korelacije između parova povišeno eksprimiranih *miR-135b-5p* i *miR-31-3p*, *miR-135b-5p* i *miR-18a-5p* i *miR-31-3p* i *miR-18a-5p*. Pozitivna korelacija je utvrđena i između sniženo eksprimiranih *miR-139-5p* i *miR-30a-5p*. Isti trend pozitivne korelacije između parova analiziranih miRNK je potvrđen analizom korelacije u okolnom netumorskom tkivu.

U okviru doktorske disertacije su prikazani rezultati asocijacije kandidat miRNK sa demografskim i kliničkopatološkim odlikama pacijenata. Značajna asocijacija je utvrđena između ekspresije *miR-31-3p* i konzumacije alkohola i pušačkog statusa. Relativni nivo *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p* i *miR-30a-5p* je bio povezan sa starošću pacijenata. Od kliničkopatoloških odlika pacijenata, histološki gradus je bio asociiran sa ekspresijom *miR-31-3p* i *miR-18a-5p*.

U rezultatima doktorske disertacije se navodi i prognostički značaj analiziranih miRNK kandidata iz meta potpisa. Pacijenti sa povišenom ekspresijom *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p* i *miR-30a-5p* su imali značajno lošije preživljavanje u poređenju sa pacijentima koji su imali nižu ekspresiju tri navedene miRNK. Ovakvi rezultati ukazuju da se *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p* i *miR-30a-5p* mogu koristiti kao potencijalni prognostički biomarkeri kod pacijenata sa oralnim karcinomom.

#### **D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

U okviru ove doktorske disertacije je analizirano 10 studija u meta-analizi što se odrazilo i na broj identifikovanih miRNK u meta potpisu u poređenju sa ranije publikovanom meta-analizom (Zeljic et al., 2018). U prethodnoj meta-analizi, identifikovani miRNK meta-potpis je sadržao 20 miRNK (Zeljic et al., 2018), dok je taj broj u doktorskoj disertaciji smanjen na 13, što ukazuje da se sa povećanjem broja studija uključenih u meta-analizu povećava preciznost identifikovanih najčešće deregulisanih miRNK molekula u meta potpisu.

Odabrane miRNK iz meta potpisa (*miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-139-5p*, *miR-30a-5p*) su validirane u grupi pacijenata sa oralnim karcinomom koji su uključeni u istraživanje u okviru

doktorske disertacije. *miR-18a-5p* je imala statistički trend za povišenu ekspresiju u tumorskom tkivu. Takvi rezultati su u skladu sa rezultatima ranije publikovane meta-analize (Zeljic et al., 2018). Iako meta-analiza sprovedena primenom metode prebrojavanja glasova ima slabu statističku moć (Tseng, Ghosh, & Feingold, 2012), rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da se ova metoda daje pouzdane podatke o deregulisanim miRNK molekulima u oralnom karcinomu, što je u skladu sa ranijim nalazima u slučaju drugih tipova malignih tumora (Y. Ma et al., 2012; Rikke, Wynes, Rozeboom, Barón, & Hirsch, 2015).

Doktorskom disertacijom je pokazano da se *miR-31-3p* može koristiti kao dobar dijagnostički biomarker u oralnom karcinomu, što je u saglasnosti sa rezultatima ranije publikovanih studija (C. J. Liu, Lin, Yang, Cheng, & Chang, 2012; Z. Lu et al., 2019). Kao i *miR-31-3p*, *miR-135b-5p* je imala povišenu ekspresiju u oralnom karcinomu, što ukazuje da ove miRNK imaju ulogu protoonkogeni u oralnom karcinomu, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima.

U ovoj doktorskoj disertaciji je potvrđeno postojanje značajne razlike u preživljavanju između pacijenata sa povišenom i sniženom ekspresijom *miR-135b-5p* pri čemu su pacijenti sa povišenom ekspresijom imali značajno kraće preživljavanje. Stoga se *miR-135b-5p* može smatrati potencijalnim prognostičkim biomarkerom oralnog karcinoma. Ovakav nalaz je u skladu sa postojećim rezultatima u literaturi za oralni karcinom (S. Li et al., 2017) i karcinom ezofagusa (C. Y. Li et al., 2019).

Rezultati doktorske disertacije ukazuju da su pacijenti sa povišenom ekspresijom *miR-18a-5p* imali kraće i lošije preživljavanje, što je usaglašeno sa rezultatima ranije publikovanih studija (Jamali et al., 2015; Xu et al., 2014; Berania et al., 2017). To sveukupno ukazuje da *miR-18a-5p* može imati ulogu potencijalnog prognostičkog biomarkera u oralnom karcinomu.

Rezultati doktorske disertacije ukazuju da je ekspresija *miR-139-5p* snižena u tkivu oralnog karcinoma u odnosu na okolno neizmenjeno tkivo, što je u skladu sa dostupnim podacima iz literature za oralni karcinom i odgovarajuće ćelijske linije (Z. Chen et al., 2017; Jiang et al., 2020; K. Wang, Jin, Ma, & Zhai, 2017). *miR-139-5p* se može koristiti kao dobar dijagnostički biomarker kako samostalno tako i u kombinaciji sa drugim miRNK molekulima i to *miR-31-3p* i *miR-30a-5p* prema nalazima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Dijagnostička moć *miR-139-5p* je potvrđena i u slučaju ranije sprovedene studije u karcinomu jezika (Duz et al., 2016).

Snižena ekspresija *miR-30a-5p* u oralnom karcinomu u poređenju sa okolnim neizmenjenim tkivom potvrđena u doktorskoj disertaciji je u saglasnosti sa podacima iz literature (Ruan, Tao, & Tan, 2018; Shiah et al., 2020). *miR-30a-5p* se pokazala kao dobar dijagnostički molekularni biomarker, što je u skladu sa nalazom da je *miR-30a* potvrđena kao biomarker u

plazmi za oralni karcinom (Pedersen et al., 2018). Potvrđeno je da je *miR-30a-5p* potencijalni prognostički biomarker, što je u skladu sa nalazom da se ova miRNK može koristiti i kao biomarker u egzozomima seruma pacijenata sa oralnim karcinomom sa recidivima nakon tretmana cisplatinom (Kulkarni et al., 2020).

#### **E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

Stojkovic G, Jovanovic I, Dimitrijevic M, Jovanovic J, Tomanovic N, Stankovic A, Arsovic N, Boricic I, Zeljic K. The meta-signature guided investigation of miRNA candidates as potential biomarkers of oral cancer. *Oral diseases* 2022; doi: 10.1111/ODI.14185. M21, IF=3,511

#### **F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „In silico karakterizacija *miRNK* meta potpisa i validacija odabranih *miRNK* kao potencijalnih prognostičkih biomarkera u oralnom karcinomu“ dr Gorana Stojkovića, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u utvrđivanju najčešće deregulisanih miRNK u oralnom karcinomu i ispitivanje dijagnostičkog i prognostičkog značaja odabranih miRNK. Sprovedenom doktorskom disertacijom je potvrđeno da se pojedinačne miRNK, kao i panel koji čine *miR-31-3p*, *miR-139-5p*, *miR-30a-5p* može koristiti kao potencijalni dijagnostički set biomarkera za senzitivnu diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva. *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p* i *miR-30a-5p* se mogu koristiti kao potencijalni prognostički biomarkeri ukupnog preživljavanja pacijenata sa oralnim karcinomom.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima dobrog metodološkog i naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Gorana Stojkovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 04.05.2022.

Članovi Komisije:

Prof. dr Nenad Arsović

---

Prof. dr Nada Tomanović

---

Prof. dr Milan Petrović

---

Prof. dr Srboljub Stošić

---

Naučni saradnik dr Ivan Jovanović

---

Mentor:

Prof. dr Milovan Dimitrijević

---

Komentor:

Prof. dr Katarina Zeljić

---