

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА ВМА
УНИВЕРЗИТЕТА ОДБРАНЕ**

Одлуком бр. 35/113 од 04.12.2023. године на 113. седници Наставно-научног већа Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду одржане 30.11.2023. године именована је Комисија за оцену завршене докторске дисертације под насловом:

„ПОВЕЗАНОСТ ПОЛИМОРФИЗАМА У ГЕНИМА ЗА НЕКОДИРАЈУЋЕ РНК СА КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИМ ПАРАМЕТРИМА И РИЗИКОМ ЗА НАСТАНАК ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ“

кандидаткиње др мед. Јелене Карајовић, Клиника за ендокринологију Војномедицинске академије у Београду
Ментор: проф. др Гордана Шупић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду

Комисија за оцену завршне докторске дисертације именована је у саставу:

1. **вс доц, др Немања Ранчић, МФ ВМА, УО- председник комисије**
2. **пп доц. др Божидар Ковачевић, МФ ВМА, УО- члан комисије**
3. **вс проф. др Ружица Козомара, МФ ВМА, УО- члан комисије**
4. **пк доц. Др Петар Ристић, МФ ВМА, УО- члан комисије**
5. **доц. др Мирјана Стојковић, Медицински факултет Универзитета у Београду- члан комисије**

На основу анализе приложене докторске дисертације, као и идејног пројекта докторске тезе, Комисија за оцену завршеног докторског рада једногласно подноси Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација написана је на 74 стране и подељена на следећа поглавља: увод (26 страна), хипотеза и циљеви истраживања (2 стране), испитаници и методе истраживања (9 страна), резултати (12 страна), дискусија (9 страна), закључци (1 страна) и литература (11 страна). Увод је илустрован са 6 слика и у њему су наведене 2 табеле. Резултати су документовани са 6 табела и 6 слика. У дисертацији су цитирани подаци из 146 референци. Рад по структури има све елементе докторске дисертације.

У приложеном докторском раду истраживање је фокусирано на процену значаја полиморфизама у генима за NOTAIR, TERC, MIR155HG, miR-196a2, miR-155 и miR-146a који би могли бити маркери ризика оболевања од папиларног карцинома штитасте жлезде и/или предиктивни маркери који указују на агресивнији тип карцинома и лошију прогнозу.

У поглављу **Увод**, др Карајовић даје јасан преглед досадашњих сазнања о папиларним карциномима штитасте жлезде.

Према дефиницији СЗО, папиларни тироидни карцином је малигни епителни тумор порекла фоликуларних ћелија који има карактеристично измењена једра, папиларну грађу и/или инвазиван раст. Ради се о најчешћем карциному ШЖ који чини око 90% новодијагностикованих случајева. Инциденца је уназад неколико деценија у сталном порасту и његова учесталост се пријављује у распону од 65-93 % у зависности од географског поднебља. Тренутно, у односу на учесталост осталих карцинома, *PTC* заузимају 13. место, док су на 6. месту најчешћих карцинома код жена. Нажалост око 10% болесника са *PTC* има агресивну форму тумора са неповољним клиничким исходом

У протеклих 15-ак година развој молекуларне биологије значајно је допринео бољем разумевању карциногенезе свих органа, па и штитасте жлезде. Све је више података који потврђују повезаност генетичких и епигенетичких промена са настанком и биолошким понашањем папиларних карцинома. Укључивање молекуларних параметара у патохистолошку анализу тумора значајно доприноси бољем сагледавању прогностичких показатеља и терапијске ефикасности

На основу наведеног, др Карајовић је поставила следеће хипотезе:

1. Полиморфизми у *TERC*, *HOTAIR*, *MIR155HG*, *miR-155*, *miR-196a2* и *miR-146a* генима могу бити у вези са етиолошким факторима, полом и годинама, или постојањем Хашимотовог тироидитиса код болесника са класичним папиларним карциномом штитасте жлезде (*PTC*).
2. Полиморфизми у истраживаним генима су у вези са неповољним клиничко-патолошким параметрима, стадијумом болести, величином тумора, присуством метастаза у лимфним чворовима или појавом рецидива болести болесника са папиларним карциномом штитасте жлезде.
3. Постоје разлике у учесталости полиморфизама у истраживаним генима између групе болесника са *PTC* и контроле групе, што указује да би полиморфизми у *TERC*, *HOTAIR*, *MIR155HG*, *miR-155*, *miR-196a2* и *miR-146a* генима могли бити маркери ризика за појаву папиларних карцинома штитасте жлезде.

За проверу хипотеза дефинисани су следећи циљеви истраживања:

1. Утврдити учесталост полиморфизама у *HOTAIR*, *MIR155HG*, *miR-155*, *TERC*, *miR-196a2* и *miR-146a* *Real-Time* методом код болесника са класичним папиларним карциномом штитасте жлезде, као и код особа контролне групе, здравих особа, без историје малигнух оболења.

2. Утврдити повезаност полиморфизама испитиваних гена са предиспозицијом за појаву папиларних карцинома штитасте жлезде поређењем са контролном групом здравих особа.
3. Утврдити повезаност испитиваних генетичких промена са клиничко-патолошким параметрима, укључујући стадијум болести, величину тумора, присуство метастаза у лимфним чворовима и појаву рецидива болести код болесника са *PTC*.
4. Утврдити повезаност полиморфизама у испитиваним генима са преживљавањем без рецидива болести (интервал времена до појаве рецидива – енгл. *Progression-free survival, PFS*).
5. Утврдити повезаност полиморфизама испитиваних гена са факторима ризика, полом, годинама као и присуством Хашимотовог тиреоидитиса код болесника са *PTC*.

У Поглављу **Материјал и методе** кандидаткиња је на прецизан начин представила дизајн истраживања. Истраживање је било спроведено по типу ретроспективне студије случај-контрола, у којој су били поређени резултати генетичких анализа са клиничко-патолошким параметрима. Други део студије била је студија асоцијације полиморфизама у испитиваним генима која је осим анализе генотипова у групи болесника укључила и анализу учесталости промена ових гена у контролној групи здравих особа, одговарајуће полне и старосне дистрибуције.

Што се **Селекције болесника** тиче у оквиру израде докторске тезе рађени су полиморфизми из постојећих парафинских узорака папиларних карцинома штитасте жлезде. У студији су били укључени болесници оба пола, старији од 18 и млађи од 80 година код којих је патохистолошки дијагностикован класични подтип *PTC*. Свим болесницима је учињена тотална тиреоидектомија, са или без лимфаденектомије, у Клиници за општу хирургију ВМА и постоперативно су праћени у Клиници за ендокринологију ВМА.

Патохистолошка класификација тумора била је извршена према петом издању класификације тумора СЗО, а стадијуми болести одређени су на основу VIII издања АЈСС (енгл. *American Joint Committee on Cancer 8th Edition*) TNM за стадијуме болести *PTC* из 2018. године. Анализирани су клиничко-патолошки фактори који се повезују са клиничким понашањем *PTC* као што су: старост болесника, пол, присуство метастаза у време операције, мултифокалност, екстратироидно ширење, лимфоваскуларна инвазија, величина тумора и присуство Хашимотовог тиреоидитиса. У студију нису били укључени болесници након лобектомије штитасте жлезде, као и болесници са претходном историјом малигнух болести.

Контролу групу за анализу полиморфизама чинили су здрави испитаници, одговарајуће старосне и полне дистрибуције, који нису имали неко малигно или системско оболење.

Говорећи о **патохистолошкој и генетској анализи препарата**, за ову дисертацију патохистолошка анализа препарата спроведена је у Институту за патологију и судску медицину ВМА, док су генетичке анализе биле спроведене у Одсеку за молекулску генетику Института за медицинска истраживања ВМА.

Анализа патохистолошких параметара учињена је на исечцима ткива карцинома из парафинских блокова дебљине 4 μ m бојених стандардном хематоксилин-еозин методом.

Геномска ДНК је изолована из узорака ткива карцинома фиксираних у формалину и укалупљених у парафину (FFPE) помоћу комерцијалног кита *Extract me*, Пољска. Полиморфизми у нуклеотидној секвенци гена били су одређивани Real-Time PCR методом, коришћењем Real-Time PCR 7500 апарата и комерцијалних есеја за анализу полиморфизама нуклеотидних секвенци (енгл. *Single Nucleotide Polymorphism, SNP*) (*Applied Biosystems, Fosters city, CA, USA*). Присуство одређене генетичке варијанте, односно одређеног алела полиморфизама детекован је методом алелске дискриминације.

За анализу полиморфизама контролне групе испитаника геномска ДНК је била изолована из узорка периферне крви, 3ml крви, са додатим антикоагулансом. За изолацију ДНК коришћен је комерцијални кит са колонама за изолацију геномске ДНК из крви, *PureLink™ Genomic DNA Kit*.

За израду ове дисертације коришћене су **следеће варијабле**:

Независне варијабле или узрок: полиморфизми у генима за TERC, HOTAIR, MI155HG, miR-196a-2 и miR-146. **Зависне варијабле:** стадијум болести (TNM, AJCC), присуство/одсуство метастаза у лимфним чворовима, појава рецидива, мултифокалност, екстратироидно ширење, лимфоваскуларна инвазија, величина тумора, присуство Хашимотовог тиреоидитиса. **„Збуњујуће варијабле”** или додатни фактори који утичу на појаву папиларног карцинома штитасте жлезде: старост и пол болесника.

Каплан-Мајерова метода и *log rang* тест су коришћени за израчунавање преживљавања без прогресије болести (PFS). Преживљавање без прогресије болести је дефинисано као време од датума дијагнозе до првог доказа о рецидиву тумора или последњег познатог статуса преживљавања.

Процена односа опасности (енгл. *Hazard ratio, HR*) са 95% интервалом поверења од 95% (енгл. *Confidence interval, CI*) је анализирана коришћењем Коксове регресионе анализе (енгл. *Cox hazard regression analysis*). Да би се патохистолошке карактеристике и генетске варијанте повезале са проценом нивоа ризика прво је урађена Коксова униваријантна пропорционална регресионе анализа. Варијабле за које је утврђено да су значајне у униваријантној анализи, укључујући оне са нивоима значајности испод 10%, накнадно су анализиране у мултиваријантном Коксовом пропорционалном

регресионом моделу да би се истовремено проценио утицај више фактора на преживљавања без прогресије болести. Логистичка регресиона анализа прилагођена полу и старости је коришћена да се тестира повезаност између анализираних полиморфизама и ризика од папиларног карцинома штитасте жлезде. Јачина повезаности је процењена коришћењем односа шансе (енгл. *Odds ratio*, OR) и 95% интервала поверења (енгл. *Confidence interval*, CI). За процену ризика коришћени су генотипски, адитивни, рецесивни, доминантни и прекомерно доминантни модели. Према адитивном моделу, сви генотипови (*wild type* хомозиготи, wt), хетерозиготи (ht) и мутирани хомозиготи (mt) подједнако доприносе фенотипу. Рецесивни модел претпоставља да мутирани хомозиготни генотип има највећи утицај на фенотип (пореде се mt са wt+ht). Са друге стране, доминантни (wt) хомозигот има најјачи утицај на фенотип (у поређењу wt наспрам ht+mt) према доминантном моделу. Прекомерно доминантни модел претпоставља да хетерозигот има најјачи утицај на фенотип (у поређењу ht са wt+mt). Вредности p мање од 0,05 су сматране значајним.

Биоинформатичке платформа су коришћене је за истраживање повезаности експресије других некодирајућих РНК са клиничким карактеристикама или подацима о преживљавању који су доступни у глобалним базама са подацима о карциному штитасте жлезде.

Студија је одобрена од Етичког одбора МФ ВМА и Етичког одбора ВМА и спроведена у сагласности са Хелсиншком декларацијом и смерницама Добре клиничке праксе.

Сви испитаници су дали писмену сагласност за учешће у студији.

У поглављу **Резултати**, ауторка приказује детаљно обрађене податке и јасно представља све добијене резултате.

Дискусија је написана јасно и прегледно, уз упоредни приказ података из литературе и добијених резултата из докторске дисертације.

Закључци сажето приказују најважније налазе који су проистекли из резултата рада.

Литература садржи 146 референци.

Б) Кратак опис постигнутих резултата

Кандидаткиња у овом поглављу детаљно представља и описује добијене резултате који показују да полиморфизми у генима за дуге некодирајуће РНК и микро РНК могу играти значајну улогу у предиспозицији појаве папиларног карцинома штитасте жлезде (*PTC*) и прогресији овог тумора. У овој студији истраживани су полиморфизми HOTAIR rs920778, MIR155HG rs1893650, TERC rs10936599, miR-155 rs767649, miR-196a2 rs11614913 и miR-146a rs2910164. Уочене су разлике у дистрибуцији генотипова HOTAIR rs920778 и MIR155HG rs1893650 полиморфизама између *PTC*

болесника и контролне групе. Анализа односа ризика (OR) прилагођеног за пол и године је показала да је HOTAIR rs920778 повезан са повећаним ризиком за појаву *PTC* (OR = 1,497), при чему је TT варијантни генотип повећавао ризик у поређењу са изворним CC генотипом (OR = 2,466) и носиоцима C-алела (CC+CT), (OR = 1,585). Генотип HOTAIR rs920778 TT био је повезан са појавом метастаза у лимфним чворовима, рецидивом тумора и преживљавањем без прогресије болести у поређењу са носиоцима C-алела. Мултиваријантна Коксова регресија је показала да су се ATA ризик (HR = 14,210) и HOTAIR rs920778 (HR = 2,811) издвојили као независни прогностички фактори за *PTC*. Полиморфизам MIR155HG rs1893650, који је по први пут истраживан код *PTC*, био је у негативној корелацији са предиспозицијом појаве *PTC*, при чему су TC хетерозиготи испољили протективни ефекат (OR = 0,268). Наши резултати сугеришу да би полиморфизми HOTAIR rs920778 и MIR155HG rs1893650 потенцијално могли да буду прогностички и биомаркери ризика код папиларних карцинома штитасте жлезде.

В) Упоредна анализа резултата докторске дисертације са резултатима из литературе

У поглављу **Дискусија**, кандидаткиња садржајно и критички сагледава резултате у складу са постојећим сазнањима добијеним анализом литературних података из области папиларних карцинома штитасте жлезде, епигенетичким модификацијама и некодирајућим РНК. Начин писања дискусије и аргументација показују да др Карајовић влада про- блематиком теме докторске тезе. Овим истраживањем су добијени нови подаци о полиморфизмима дугих некодирајућих РНК, с тим да полиморфизам MIR155HG до сада никада није испитиван у *PTC*. Резултати ове студије су показали потенцијално нове прогностичке и биомаркере ризика код *PTC*.

Г) Објављени радови из докторске дисертације

Jelena Karajovic, Bozidar Kovacevic, Bojana Uzelac, Debora Stefik, Bojana Jovanovic, Petar Ristic, Snezana Cerovic Gordana Supic. Association of HOTAIR, MIR155HG, TERC, miR-155, -196a2 and -146a Genes Polymorphisms with Papillary Thyroid Cancer Susceptibility and Prognosis. *Cancers*, 15, x., 2023., doi.org/10.3390/xxxxx, IF=5.2, M21. (*Прихваћен рад са издатим сертификатом*).

Д) Предлог Комисије

Комисија нема корекција рукописа докторске дисертације др Јелене Карајовић.

Ђ) Закључак

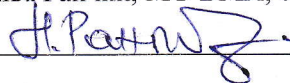
Кандидат др Јелена Карајовић испуњава све услове који обухватају написану докторску дисертацију и објављен рад у ком је први аутор, а који је проистекао из ове тезе и који је прихваћен у часопису M21 (истакнут међународни часопис) са IF-5,2.

Докторска дисертација „ПОВЕЗАНОСТ ПОЛИМОРФИЗАМА У ГЕНИМА ЗА НЕКОДИРАЈУЋЕ РНК СА КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИМ ПАРАМЕТРИМА И РИЗИКОМ ЗА НАСТАНАК ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ“ представља оригиналан и актуелна рад из епигенетике и клиничке медицине. Истраживање је спроведено према начелима етичког приступа и научно-истраживачког рада, а теза написана студиозно и систематично. Добијени резултати дају значајан допринос сагледавању фактора ризика за настанак папиларних карцинома штитасте жлезде, као и процене агресивности карцинома и терапијског исхода.

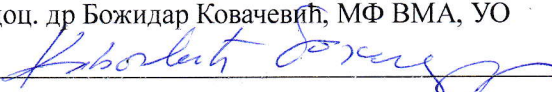
На основу свега наведеног Комисија закључује да докторска дисертација др Јелене Карајовић испуњава све предвиђене критеријуме које захтева академска пракса и да даје значајан допринос проучавању у датој области. С обзиром да кандидаткиња испуњава све законом предвиђене услове за одбрану докторске дисертације, комисија једногласно предлаже Одбору за докторске студије и научно-истраживачку делатност Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране да извештај прихвати и предложи Научно-наставном већу МФ ВМА УО да овај рад прихвати као завршену докторску дисертацију кандидаткиње др Јелене Карајовић и одобри јавну одбрану.

У Београду 08.12.2023.

1. вс доц, др Немања Ранчић, МФ ВМА, УО- председник комисије



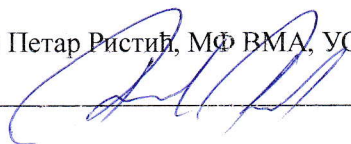
2. пп доц. др Божидар Ковачевић, МФ ВМА, УО



3. вс проф. др Ружица Козомара, МФ ВМА, УО



4. пк доц. Др Петар Ристић, МФ ВМА, УО



5. доц. др Мирјана Стојковић, Медицински факултет Универзитета у Београду

