

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16-ZK, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Povezanost hipermetilacije promotora *BRCA1*, *P16*, *MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena i toka bolesti bolesnica sa estrogen-receptor, progesteron-receptor i her-2 receptor negativnim karcinomom dojke“

kandidata dr Zorana Kozomare, zaposlenog u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Mentor je Prof.dr Radan Džodić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu; a komentor je N.Sav. dr sci med Mirjana Branković Magić, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Svetislav Tatić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof.dr Vesna Plešinac Karapandžić, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. N.Sar. dr sci med Snežana Šušnjar, , Institut za onkologiju i radiologiju Srbije.

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 Zorana Kozomare napisana je na ukupno 88 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 3 tabele, 23 grafikona i 3 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

Uvod sadrži poglavlja: definiciju karcinoma dojke, epidemiologiju, faktore rizika za nastanak karcinoma dojke, određivanje kliničkog stadijuma sa TNM klasifikacijom, prognostičke i predikivne faktore rizika, biološku klasifikaciju karcinoma dojke, epigenetičke promene, hipermetilaciju promotora *BRCA1*, *P16*, *MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena uključenih u studiju. Navedeno je da je karcinom dojke najzastupljenije maligno oboljenje i jedan od vodećih

uzroka smrtnosti od malignih oboljenja među ženama u industrijski-razvijenim zemljama; u najvećoj meri zbog sklonosti primarnih karcinoma dojke da metastaziraju do limfnih čvorova u pazušnoj jami i udaljenih mesta u organizmu. Navodi se da predstavlja najrasprostranjeniji maligni tumor kod žena, odgovoran za 20% smrtnih ishoda u onkologiji, po čemu je u populaciji između 30-55-te godine, na prvom mestu. Posebno je istaknut trostruko-negativni karcinom koji predstavlja subtip karcinoma dojke koji zauzima 15-20% od svih karcinoma dojke, karakteriše se odsustvom receptora za ER i PR, kao i odsustvom povećane ekspresije Her-2 receptora. Navodi se da kao posledica agresivnog tumorskog fenotipa, nemogućnosti sprovođenja ciljane antitumorske terapije zbog odsustva pomenutih receptora, kao i parcijalnog odgovora na hemioterapije koje se primenjuju za karcinom dojke, ovaj subtip ima lošu prognozu. Detaljno su opisani faktori rizika za nastanak karcinoma dojke i prikazana je pregledna TNM klasifikacija karcinoma dojke. Jasno su prikazani prognostički i prediktivni faktori, kao i biološki markeri: steroidni receptori, HER2 i ki-67. Detaljno je obrazložena biološka klasifikacija karcinoma dojke. Prikazan je i značaj epigenetičkih promena u genomu, a posebno hipermetilacije promotora gena: *BRCA1*, *P16*, *MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1*.

Ciljevi rada su precizno definisani. Navodi se da je cilj utvrditi da li metilacioni status promotora ispitivanih *BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena kod bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke, kao prognostički najlošijom grupom karcinoma dojke sa agresivnim fenotipom, može da se poveže sa kliničkim tokom bolesti i da posluži kao eventualni pokazatelj prognoze bolesti. Tako da je prvo određen hipermetilacioni status ispitivanih gena (*BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1*) u grupi bolesnica trostruko negativnog karcinoma dojke i kontrolnoj grupi bolesnica (ER+PR+Her2-); potom je cilj bio uporediti dobijene rezultate sa klasičnim faktorima prognoze obolelih od trostruko negativnog karcinoma dojke da bi se utvrdilo da li se metilacioni status analiziranih gena može povezati sa parametrima koji ukazuju na lošu/dobru prognozu bolesti. Cilj je bio uporediti dobijeni rezultate sa parametrima kliničkog toka bolesti (učestalost relapsa, DFS i OS), utvrditi da li se tok bolesti, kao i odgovor na primenjenu adjuvantnu terapiju karcinoma dojke može povezati sa metilacionim statusom analiziranih gena.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da su u rad uključena 131 bolesnica sa karcinomom dojke koje su na početku lečenja bile podvrgnute hirurškom lečenju (61 sa trostruko negativnim karcinomom dojke, a drugu grupu čini 70 bolesnica koje spadaju u najbolju prognostičku grupu karcinoma dojke (ER+, PR+, Her2-). Navodi se da su bolesnice dale svoju pismenu saglasnost za učešće u ovoj istraživačkoj studiji i da su praćene između 1 i 87 meseci (medijana 78 meseci). Hipermetilacioni status promotorskog regiona *BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena je određivan u tumorskom tkivu, obzirom da je metilacija tkivno i tumor specifična. DNK iz uzoraka sveže smrznutog tumorskog tkiva je

izolovana metodom izoliranja. Određivanje hipermetilacije promotora specifičnih gena je urađeno metilaciono-specifičnim PCR metodom na Institutu za medicinska istraživanja VMA.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

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 234 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata Poređenje hipermetilacije promotora *BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena pokazalo je da se ove dve grupe statistički značajno razlikuju samo u odnosu na učestalost hipermetilacije promotora *p16* gena – statistički značajno veći broj hipermetilacija promotora gena pronađen je u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke, 33 (54.1%) vs. 20 (28.6%), $p=0.00298$. Iako nije pokazana statistički značajna razlika u učestalosti hipermetilacije promotora *BRCA1* gena između ispitivanih grupa bolesnica, uočen je trend ka većem broju hipermetilacija u trostruko negativnom karcinomu dojke grupi bolesnica: 33 (54.1%) prema 27 (38.6%), χ^2 test, $p=0.0752$. Ako se posmatra učestalost ko-metilovanih gena uočava se da je učestalost kometilovanih promotora *p16* i *RASSF1A* (*p16+RASSF1A+*) gena značajno veća u trostruko negativnom karcinomu dojke grupi nego u ER+PR+Her2- grupi : 20 (32.8%) prema 10 (14.3%), χ^2 test, $p=0.0225$. Pokazano je da se u trostruko negativnom karcinomu dojke grupi bolesnica veća učestalost hipermetilacije promotora *CDH1* gena javlja u podgrupi bolesnica sa prisutnim regionalnim metastazama u limfnim čvorovima (χ^2 test, $p=0.01952$). Kada se upoređi ko-metilacija *p16* i *RASSF1A* gena, (*p16+RASSF1A+*), uočava se da je DFS značajno kraći kod bolesnica sa oba metilovana gena iz trostruko negativnog karcinoma dojke grupe u odnosu na ER+PR+Her-2- grupu, log-rank test, $p=0.03272$.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U literaturi se navodi da se trostruko negativni karcinom dojke češće javlja kod mladih žena, naročito onim sa višim indeksom telesne mase; tumori trostruko negativnog karcinoma dojke su višeg gradusa, visok je mitotski indeks; često je pri dijagnostikovanju uznapredovali stadijum sa zapaljenskim karcinomom dojke. I ova studija je pokazala da je histološki gradus 3 bio izrazito češće zastupljen u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke nego u

ER+PR+Her2- grupi bolesnica: 31 (50.8%) prema 1 (1.4%). Takođe nije bilo bolesnice sa histološkim gradusom 1 kao u grupi bolesnica ER+PR+HER2- karcinom dojke (8,6%). Analiza nuklearnog gradusa između ispitivanih grupa bolesnica pokazala je slične rezultate.

Statistički značajnu razliku u zastupljenosti histoloških tipova invazivnog karcinoma dojke pronađene su u ove dve ispitivane grupe gde je invazivni duktalni karcinom bio najučestaliji histološki tip tumora (38 - 62.3% u grupi trostruko negativnog karcinoma; 31 – 44.3% u ER+PR+Her2-). Invazivni lobularni karcinom je bio izrazito češće zastupljen u grupi ER+PR+Her2- (34 – 48.6%) nego u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke (8 – 13.1%). Prisustvo medularnog histološkog tipa detektovano je samo u grupi sa trostruko negativnim karcinomom dojke sa učestalošću od 13.1% (n=8).

U ovoj studiji nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti ponovnog javljanja bolesti (relapsa) između ispitivanih grupa, a kao mogući razlog se navodi medijana praćenja bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke koja je u ovoj studiji 43 meseca, i to je kritično vreme za javljanje relapsa kako navodi više studija. Ipak je u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke registrovan nešto veći broj relapsa (29.5%) u odnosu na učestalost relapsa u ER+PR+Her2- grupi(17.1%) .

U studiji Hennigs-a i saradnika je ustanovljeno da trostruko negativni karcinom dojke ima lokalnu kontrolu i ukupnu stopu preživljavanja od 89,6% i 78,5%, respektivno, u poređenju sa 99,1% i 95,1% kod bolesnica sa luminalnim tumorima tipa A . Tako da su luminal A i trostruko negativni karcinom dojke ekstremi u pogledu prognoze. I ova studija je pokazala statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa u odnosu na DFS. DFS je bio značajno kraći u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke; 29.5% ponovnih javljanja bolesti prema 17.1% nađenih u grupi ER+PR+Her2- karcinom dojke. Upoređivanje OS između grupa takođe je ukazalo na značajno kraće preživaljavanje bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke u odnosu na obolele od ER+PR+Her2- karcinom dojke tako da je u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke je zabeleženo 22.9% smrtnih ishoda prema 7.1% u ER+PR+Her2- grupi.

Dobijeni rezultati ove studije ukazuju da nema statističke značajnosti u učestalosti *BRCA1* hipermetilacije između ispitivanih grupa bolesnica, ali je uočen trend ka većem broju hipermetilacija promotora *BRCA1* gena u grupi bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke u poređenju sa ER + PR + Her2- gupom. I druge studije navode da se

BRCA1 hipermetilacija češće javlja kod trostruko negativnog karcinoma dojke, u poređenju sa drugim sporadičnim karcinoma dojke (212). Meta-analiza otkrila je da je hipermetilacija **BRCA1** povezana sa lošim preživljavanjem kod bolesnica sa karcinomom dojke.

Poređenje parametara tumora sa učestalošću metilacija ispitivanih gena kako u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke, tako i u ER+PR+Her2- grupi, pokazalo je da se u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke statistički značajno veća učestalost hipermetilacije **CDH-1** gena vezuje za bolesnice sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima.

Dobijeni rezultati ispitivanja su takođe pokazali da je u grupi bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke značajno veća učestalost hipermetilovanog promotora **O⁶MGMT** gena nađena u podgrupi bolesnica bez lokalnog recidiva u odnosu na bolesnice sa lokalnim recidivom. Meta-analiza iz 2017. godine je ukazala na to da metilacija promotora **MGMT** gena može biti rani biomarker za uspostavljanje dijagnoze karcinoma dojke. Hipermetilacija **MGMT** može biti i faktor predviđanja dobrog odgovora na alkilirajuće agense, pa se u tom smislu možda mogu tumačiti i dobijeni rezultati, obzirom da je većina bolesnica u ovoj grupi trostruko negativnog karcinoma dojke primala adjuvantnu hemioterapiju u koju su bili uključeni i alkilirajući agensi (ciklofosamid i 5-fluorouracil).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

ORIGINAL ARTICLE

Promoter hypermethylation of *p16*, *BRCA1* and *RASSF1A* genes in triple-negative breast cancer patients from Serbia

Zoran Kozomara, Gordana Supic, Ana Krivokuca, Zvonko Magic, Radan Dzodic, Zorka Milovanovic, Mirjana Brankovic-Magic. *JBUON* 2018; 23(3): 684-691
ISSN: 1107-0625, online ISSN: 2241-6293 • www.jbuon.com

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Povezanost hipermetilacije promotora *BRCA1*, *P16*, *MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena i toka bolesti bolesnica sa estrogen-receptor, progesteron-receptor i her-2 receptor negativnim karcinomom dojke“ dr Zorana Kozomare, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos.

Istraživanje inaktivacije gena putem epigenetičkog mehanizma hipermetilacije u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke je prvo istraživanje ovog tipa u našoj zemlji. Metilacija gena je tumor specifična i dovodi do isključivanja funkcije gena koji učestvuju u različitim signalnim putevima od važnosti za proces kancerogeneze. Rezultati ove studije pomoći će

boljem razumevanju biološkog ponašanja inače agresivnih trostruko negativnih karcinoma dojke.

Sa aspekta heterogenosti tumora, određivanje metilacionog statusa gena može da pomogne boljoj subklasifikaciji karcinoma dojke. Povezivanje podataka sa odgovorom na primenjene antitumorske terapije i metilacionog statusa ispitivanih gena može doprineti uvođenju personalizovane terapije u onkologiji.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima 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 Zorana Kozomare i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 20.6.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Svetislav Tatić

Prof.dr Vesna Plešinac Karapandžić

Magić

N.Sar. dr sci med Snežana Šušnjar

Mentor:

Prof.dr Radan Džodić

Komentor:

N.Sav. dr sci med Mirjana Branković
