

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На IX редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 13.07.2021. године, на основу молбе ментора, др **Емине Малишић**, вишег научног сарадника Института за онкологију и радиологију Србије и др **Маје Чакић-Милошевић**, ванредног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Иване Ж. Бољевић**, истраживача сарадника на Институту за онкологију и радиологију Србије под насловом: „Утицај експресије *JAM-A*, *ITGAV* и *CALDI* гена на метастатски потенцијал ћелија хуманог карцинома јајника“, у саставу: др **Емина Малишић**, виши научни сарадник, Институт за онкологију и радиологију Србије, др **Маја Чакић-Милошевић**, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет и др **Радмила Јанковић**, научни саветник, 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 20.09.2018. године донело одлуку да даје сагласност на предлог теме докторске дисертације **Иване Ж. Бољевић** под насловом: „Утицај експресије *JAM-A*, *ITGAV* и *CALDI* гена на метастатски потенцијал ћелија хуманог карцинома јајника“.

Докторска дисертација **Иване Ж. Бољевић** урађена је на Институту за онкологију и радиологију Србије, у Лабораторији за молекуларну генетику, Одељења за експерименталну онкологију. Министарство просвете, науке и технолошког развоја је омогућило израду ове дисертације у оквиру пројекта 41026 „Фармакодинамска и фармакогеномска испитивања новијих лекова у лечењу солидних тумора“. Истраживање, за које је дато одобрење Етичког одбора Института бр. 2693-01 од 24. јула 2018. године, спроведено је на узорцима ткива јајника болесница оперисаних на Институту за онкологију и радиологију Србије.

Докторска дисертација је написана на 97 страна и састоји се из следећих поглавља: Увод (24 стране), Циљеви истраживања (1 страна), Материјал и методе (13 страна), Резултати (22 стране), Дискусија (15 страна), Закључци (2 стране) и Литература (20 страна). Дисертација садржи 22 слике и то: 7 у поглављу Увод, 3 у поглављу Материјал и методе и 12 у поглављу Резултати. Дисертација садржи укупно 15 табела и то: 1 у поглављу Увод, 3 у поглављу Материјал и методе и 11 у поглављу Резултати. Дисертација садржи и 8 уводних страна и то: насловну страну на српском и енглеском језику, страну са подацима о менторима и члановима комисије, захвалницу, сажетак на српском и

енглеском језику и садржај. На крају дисертације приложена су следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (5 страна).

Анализа докторске дисертације

У **Уводу** докторске дисертације описана је хистолошка грађа јајника, фактори ризика за настанак канцера јајника, епидемиологија овог малигнитета, класификација тумора јајника са посебним освртом на класификацију малигних епителних тумора јајника (карцинома) на основу механизма туморогенезе, клиничког понашања, ћелијског порекла као и молекуларних алтерација које их карактеришу. Такође, описане су и доступне скрининг методе као и прогностички фактори и терапијски приступи у лечењу овог малигнитета. Посебан део увода односи се на епително-мезенхимску транзицију (ЕМТ) као процес који се јавља у ембрионалном развићу и репарацији ткива приликом повреде али је и један од кључних процеса у прогресији карцинома услед способности епителних ћелија да стекну карактеристике мезенхимских ћелија као што су миграторни капацитет, инвазивност, отпорност на апоптозу и способност продукције ензима који разграђују ванћелијски матрикс. Детаљно су описане ћелијске промене које се дешавају током процеса ЕМТ, транскрипциони фактори који регулишу и сигнални путеви који активирају овај процес. Потом је описана структура и функција протеина укључених у процес ЕМТ, кодираних генима чији је утицај експресије на метастатско ширење карцинома јајника био предмет ове докторске дисертације. Тако су описани: адхезивни спојни молекул А (енгл. *junctional adhesion molecule A*, JAM-A) који је трансмембрански гликопротеин конституент чврстих међућелијских веза; интегрин алфа V (енгл. *integrin alpha V*, ITGAV) који је члан фамилије интегрина, молекула важних за успостављање веза између ћелија и протеина ванћелијског матрикса и калдезмон 1 (CALD1) који представља актин-везујући протеин цитоскелета који има важну улогу у регулацији актино-миозинског контрактилног система. Посебан осврт дат је на улогу ових протеина у ћелијској адхезији и миграцији чије нарушавање може да доведе до туморске инвазије и метастатског ширења карцинома јајника.

Примарни **Циљ истраживања** докторске дисертације био је испитивање улоге *JAM-A*, *ITGAV* и *CALD1* гена у метастатском ширењу и прогнози карцинома јајника. У складу са тиме кандидаткиња је поставила специфичне подциљеве:

- утврђивање разлика у нивоу релативне експресије *JAM-A*, *ITGAV* и *CALD1* гена између бенигних и малигних узорака тумора јајника
- испитивање корелација између нивоа релативне експресије *JAM-A*, *ITGAV* и *CALD1* гена и карактеристика болесница, хистопатолошких карактеристика тумора, клиничких карактеристика болести и укупног преживљавања болесница са карциномом јајника

- утврђивање дијагностичког и прогностичког дискриминаторног потенцијала нивоа експресије *JAM-A*, *ITGAV* и *CALD1* гена у карциному јајника
- утврђивање присуства протеинске експресије у узорцима тумора јајника за ген(е) од интереса
- биоинформатичке анализе *JAM-A*, *ITGAV* и *CALD1* генске и протеинске експресије у карциному јајника

У поглављу **Материјал и методе**, наведене су одлике испитиване групе. Групу је чинило 77 узорака ткива примарних тумора јајника фиксираних формалином и укалупљених у парафин од којих 57 малигну епителних тумора јајника и то болесница које нису примале неoadјувантну терапију пре хируршког захвата и 20 бенигну тумора јајника. Карактеристике болесница са карциномом јајника (старост, статус менопаузе), клиничке карактеристике болести (FIGO стадијум (фр. *Federation Internationale de Gynecologie et Obstetrique*), присуство резидуалне болести, присуство асцита, присуство лимфних, перитонеалних и удаљених метастаза и присуство релапса) и хистопатолошке карактеристике карцинома (хистолошки тип и хистолошки градус) јајника приказане су табеларно. Потом су дати описи процедура које су коришћене при извођењу неопходних експеримената за реализацију постављених потциљева. У мањим логички одвојеним поднасловима објашњени су извођени поступци изолације укупне РНК из парафинских узорка тумора јајника, реверзне транскрипције РНК, методе квантитативне ланчане реакције полимеразе, имунохистохемијског бојења *JAM-A* протеина, биоинформатичке анализе *JAM-A*, *ITGAV* и *CALD1* генске и протеинске експресије у карциному јајника као и тестови и методе који су коришћени за статистичку обраду резултата.

Резултати докторске дисертације се могу поделити на осам целина. Резултати су представљени табеларно и графички. У првој целини у виду *box-plot*-ова је графички приказана релативна експресија *JAM-A*, *ITGAV* и *CALD1* гена код малигну у односу на бенигну туморе јајника. Показано је да су медијане нивоа експресије *ITGAV* и *CALD1* биле статистички значајно ниже, а да је медијана експресије *JAM-A* гена била виша у групи малигну у односу на бенигну туморе јајника. У другој целини су табеларно приказане корелације експресија *JAM-A*, *ITGAV* и *CALD1* гена са карактеристикама болесница и клиничкопатолошким параметрима карцинома јајника. У испитиваној групи није показана статистички значајна корелација ових параметара и различитих нивоа експресије *JAM-A*, *ITGAV* и *CALD1* гена. Ипак, забележен је статистички тренд повишене експресије *JAM-A* гена у туморима високог градуса (градус 2 и 3) као и у узорцима карцинома јајника код којих је забележено присуство асцита. Статистички тренд снижене експресије *ITGAV* гена детектован је у туморима високог градуса, у узорцима карцинома јајника код којих је забележено присуство асцита, као и у узорцима болесница које су релапсирале. Такође, статистички тренд снижене експресије *CALD1* гена уочен је у туморима високог градуса. У трећој целини табеларно су приказани резултати испитивања дијагностичког и

прогностичког потенцијала експресионих нивоа одабраних гена коришћењем ROC (енгл. *Receiver Operating Characteristics*) кривих. Применом ове анализе испитивано је постојање граничне вредности експресије *JAM-A*, *ITGAV* и *CALDI* гена која раздваја бенигне од малигнух тумора јајника (дијагностички потенцијал) као и граничне вредности која раздваја добар од лошег исхода болести тј. релапса и/или смртног исхода (прогностички потенцијал). Показано је да само експресија *JAM-A* гена има дијагностички и прогностички потенцијал са граничним вредностима експресије од 1,14 у случају дијагностичког и 1,80 у случају прогностичког дискриминаторног потенцијала. У четвртој целини су табеларно приказани резултати корелација између експресија испитиваних гена и показано је да су експресије *ITGAV* и *CALDI* гена статистички значајно позитивно корелисане, док су негативно корелисане са експресијом *JAM-A* гена.

У петој целини су приказане Каплан-Мајерове (енгл. *Kaplan-Meier*) криве укупног преживљавања болесница са карциномом јајника као и укупног преживљавања у односу на ниску/високу експресију *JAM-A*, *ITGAV* и *CALDI* гена. Показано да болеснице са повишеном експресијом *JAM-A* као и сниженом експресијом *ITGAV* и *CALDI* имају краћу медијану укупног преживљавања, иако те разлике нису биле статистички значајне. У шестој целини приказани су резултати униваријантне Коксове регресионе анализе у циљу утврђивања односа између експресије испитиваних гена и појединих клиничкопатолошких параметара болести са једне стране, и укупног преживљавања болесница са карциномом јајника са друге стране. Асоцијације су изражене као односи ризика (енгл. *Hazards Ratio*, HR) са 95% интервалом поверења. У испитиваној групи болесница показано је да статистички значајан ефекат на преживљавање остварују следеће клиничке променљиве: FIGO стадијум, перитонеалне метастазе и резидуални тумор. С обзиром на недовољан број догађаја (смртних исхода) по предикторској варијабли у испитиваној групи болесница, параметри који су се показали значајним у униваријантној Коксовој регресионој анализи, нису убацивани у мултиваријантни Коксов регресиони модел.

С обзиром да је показано да *JAM-A* има дијагностички и прогностички потенцијал у испитиваној групи болесница, у седмој целини приказани су резултати анализе протеинске експресија *JAM-A*. Имунохистохемијска анализа показала је позитивну експресију *JAM-A* протеина у групи бенигнух тумора јајника у епителу и строми, с тим што је интензитет бојења био већи у строми. Код карцинома јајника *JAM-A* имуноекспресија детектована је у строми и у епителу, и то како у мембрани тако и цитоплазми епителних ћелија карцинома јајника.

У осмој целини дати су резултати биоинформатичких анализа *JAM-A*, *ITGAV* и *CALDI* генске и протеинске експресије у карциному јајника. На основу GEPIA (енгл. *Gene Expression Profiling Interactive Analysis*) базе података, уочена је статистички значајно повишена експресија *JAM-A* гена у канцерском у односу на здраво ткиво јајника. У случају *ITGAV* и *CALDI* гена уочена је снижена експресија у канцерском ткиву јајника, док је у случају *CALDI* гена та разлика била и статистички значајна. На основу података

из HPA (енгл. *Human Protein Atlas*) показано је да преко 70% узорака карцинома јајника показује умерен или јак интензитет имунохистохемијског бојења JAM-A протеина, док се он у здравом јајнику не детектује. У случају експресије ITGAV и CALD1 протеина ситуација је обрнута: у здравом јајнику детектују се ћелије које показују умерен до јак интензитет бојења, док је експресија слаба или одсутна у свим анализираним исечцима карцинома јајника. Локализација JAM-A, ITGAV и CALD1 протеина била је на мембрани и у цитоплазми, док је ITGAV протеин детектован и у нуклеусу нормалних ћелија јајника. На основу STRING (енгл. *The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*) анализе показано је да JAM-A и ITGAV остварују функционалне интеракције, док је проширена анализа показала да се JAM-A, ITGAV и CALD1 могу сматрати биолошки повезаном групом протеина. Анализа обогаћивања скупа гена (енгл. *Gene Set Enrichment Analysis, GSEA*) је спроведена на експресионом сету GSE9891 који је садржао 285 болесница оболелих од карцинома јајника подељених у групе са ниском и високом експресијом JAM-A, ITGAV и CALD1. По пет најзначајнијих диференцијално експримираних генских сетова у групи болесница са високом експресијом JAM-A, ITGAV и CALD1 су приказани табеларно. Такође је дат графички приказ статистички значајно обогаћених ЕМТ сигналних путева у групи болесница са карциномом јајника са високом експресијом JAM-A, ITGAV и CALD1 гена. То су PI3K/AKT/mTOR (за JAM-A), TNF- α путем NF- κ B и IL6-JAK-STAT3 (за ITGAV) и TGF- β сигнални пут (за CALD1).

У поглављу **Дискусија**, подељеном на седам потпоглавља, изнето је тумачење добијених експерименталних резултата, критичка анализа као и њихово поређење са подацима из литературе. Први део дискусије односи се на значај испитивања нових биомаркера у карциному јајника, као и на потребу за потпунијим разумевања молекуларних догађаја који доприносе туморској инвазији и метастатском ширењу болести. У другом делу дискусије кандидаткиња описује различите механизме метастатског ширења карцинома јајника и то пре свега перитонеално али и лимфогено и хематогено. У трећем делу дискусије кандидаткиња разматра улогу процеса ЕМТ у патогенези и метастатском ширењу карцинома јајника, факторе који га индукују, као и разлоге опредељења за испитивање експресије JAM-A, ITGAV и CALD1 гена пре свега због њихове улоге у ћелијској адхезији, повезаности ћелије са компонентама ванћелијског матрикса и миграцији. Такође, кандидаткиња сугерише потенцијалан правац кретања будућих истраживања. У следећа три потпоглавља разматрана је улога експресије испитиваних гена у прогресији карцинома јајника али и у другим малигнитетима, објашњени су потенцијални механизми који доводе до агресивнијег малигног фенотипа и сигнални путеви које индукују протеини кодирани овим генима. Такође, кандидаткиња истиче да је истраживање спроведено на репрезентативном узорку болесница са карциномом јајника јер је показано да у испитиваној групи статистички значајан ефекат на преживљавање остварују FIGO стадијум, перитонеалне метастазе и резидуални тумор који се убрајају међу најзначајније прогностичке факторе у карциному јајника. У седмом

потпоглављу кандидаткиња даје осврт на клинички значај EMT; потешкоће у идентификацији туморских ћелија које су активирале овај процес *in vivo*; развој циљаних терапија које би спречиле дисеминацију канцерских ћелија и развој метастаза.

У поглављу **Закључци** сумирани су најважнији закључци који су произашли из експеримената и резултата анализе *JAM-A*, *ITGAV* и *CALDI* генске експресије у узорцима болесница са тумором јајника, као и на основу резултата биоинформатичких анализа. Као општи закључак кандидаткиња наглашава да добијени резултати указују да су повишена експресија *JAM-A*, као и снижена експресија *ITGAV* и *CALDI* повезане са агресивнијим фенотипом карцинома јајника и лошијом прогнозом болести. Одређивање нивоа експресије ових биомаркера у примарном тумору могло би допринети адекватнијем праћењу болесница са карциномом јајника.

Литература садржи 379 библиографских јединица. Библиографске јединице су адекватно цитиране у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Boljevic I**, Malisic E, Milovic Kovacevic M, Jovanic I, Jankovic R. Expression levels of genes involved in cell adhesion and motility correlate with poor clinicopathological features of epithelial ovarian cancer. *J BUON*. 2020;25(4):1911-1917. **IF₂₀₂₀= 2,533**
M23
<https://www.jbuon.com/archive/25-4-1911.pdf>
2. **Boljevic I**, Malisic E, Milovic-Kovacevic M, Jovanic I, Bukumiric Z, Jankovic R. High expression of junctional adhesion molecule-A is associated with poor survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Int J Biol Markers*. 2019;34(3):262-268. **IF₂₀₁₈= 1,767**
M23
<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1724600819850178>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Boljevic I**, Malisic E, Krivokuca A, Jankovic R. Expression of CALD1 gene in ovarian cancer pathogenesis. ESGO 2017 - 20th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology, 4-7 November 2017, Vienna, Austria. *Int J Gynecol Cancer* 2017; 27 (Suppl 4): 269., **M34**
2. **Boljevic I**, Malisic E, Jovanic I, Jankovic R. Expression of integrin alpha V gene in epithelial ovarian cancer pathogenesis. The third meeting of the Serbian Association for Cancer Research with international participation. 6-7 October 2017, Belgrade, Serbia. Abstract book, p.31., **M34**
3. Malisic E, **Boljevic I**, Krivokuca A, Jankovic R. Expression of the epithelial-mesenchymal transition related genes ITGAV and F11R in ovarian tumorigenesis. IGCS 2016 - 16th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, 29-31 October 2016, Lisbon, Portugal. *Int J Gynecol Cancer* 2016; 26 (Suppl 3): 153., **M34**

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње **Иване Бољевић**, број индекса **Б3041/2013** послата је дана **11.06.2021.** на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментори су добили **12.06.2021.**

Резултати електронске провере подударања обима и садржине текста ове докторске дисертације са текстовима који су доступни за поређење уз помоћ специјализованог софтвера iThenticate показују да индекс подударности износи 8%. Анализом добијеног Извештаја и поклапања по сегментима, уочено је да је овај степен подударности последица појединачних методолошких описа, термина на енглеском језику, скраћеница, уобичајених израза и кратких фраза карактеристичних за тематику докторске дисертације, претходно публикованих резултата истраживања кандидаткиње који су проистекли из њене дисертације, поклапања у личним именима, звањима чланова комисије, називима институција, места, поглавља, цитирања литературе. Детаљнијом анализом установљено је да подударност са сваким од наведених извора износи 1% или мање од 1%, а наведена преклапања краћих делова појединих реченица нису повезана и не чине смислену целину. Уочене подударности су прихватљиве и у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду („Гласник Универзитета у Београду“ број 201/18).

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње **Иване Бољевић**, под насловом **”Утицај експресије JAM-A, ITGAV и CALDI гена на метастатски потенцијал ћелија хуманог карцинома јајника“**, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидаткиње **Иване Ж. Бољевић**, под насловом „Утицај експресије *JAM-A*, *ITGAV* и *CALDI* гена на метастатски потенцијал ћелија хуманог карцинома јајника“ представља оригинални научни рад. Током израде и писања докторске дисертације, кандидаткиња је показала висок степен познавања научне проблематике којом се бави докторска дисертација, способност за самостални научно-истраживачки рад, постављање јасних циљева и њихову реализацију, критичко разматрање добијених резултата и доношење адекватних закључака. Резултати ове докторске дисертације могу допринети бољем разумевању улоге експресије *JAM-A*, *ITGAV* и *CALDI* гена на метастатско ширење карцинома јајника, могућем откривању нових дијагностичких и прогностичких биомаркера као и предвиђању клиничког исхода болести и одређивању адекватнијег приступа у лечењу болесница са овим малигнитетом. Резултати проистекли из ове докторске дисертације су публиковани у два међународна часописа и презентовани на три међународна конгреса.

Стога Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње **Иване Ж. Бољевић** под називом „Утицај експресије *JAM-A*, *ITGAV* и *CALDI* гена на метастатски потенцијал ћелија хуманог карцинома јајника“ и тиме омогући кандидаткињи јавну одбрану докторске дисертације.

КОМИСИЈА:

У Београду, 22.07.2021. године

др Емина Малишић, виши научни сарадник,
Институт за онкологију и радиологију Србије

др Маја Чакић-Милошевић, ванредни професор,
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

др Радмила Јанковић, научни саветник,
Институт за онкологију и радиологију Србије