

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ- БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На VI редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 08.04.2022. године, на основу молбе ментора, др Бата Кораћа, ванредног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду и др Александре Јанковић, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Анђелике Т. Калезић**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, под насловом: **„Метаболички и редокс профил ћелија тумора и масног ткива дојке пременопаузалних жена: веза са гојазношћу“**, у саставу: др Александра Кораћ, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, др Биљана Срдић Галић, редовни професор, Универзитет у Новом Саду-Медицински факултет и др Милица Лабудовић Боровић, ванредни професор, Универзитет у Београду-Медицински факултет.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Анђелике Т. Калезић**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, под насловом: **„Метаболички и редокс профил ћелија тумора и масног ткива дојке пременопаузалних жена: веза са гојазношћу“** урађена је на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду и на Биолошком факултету Универзитета у Београду у оквиру пројекта 173055 Министарства просвете науке и технолошког развоја Републике Србије: „Бело или/и мрко: значај масног ткива у одржању укупне редокс зависне метаболичке контроле у физиолошким адаптацијама и метаболичким поремећајима”.

Докторска дисертација је написана на 125 страна и састоји се из следећих поглавља: Увод (18 страна), Циљеви истраживања (1 страна), Материјал и методе (9 страна), Резултати (49 страна), Дискусија (17 страна), Закључци (2 стране), Литература (28 страна) и Биографија аутора (1 страна). Дисертација садржи 5 схема у поглављу Увод, 51 фигуру у поглављу Резултати, 4 табеле (3 у поглављу Материјал и методе и 1 у поглављу Резултати и садржи 327 цитираних библиографских јединица. Дисертација садржи и 9 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 3 стране садржаја. На крају дисертације приложена су следећа документа: Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (4 стране).

Анализа докторске дисертације

Бројне болести, укључујући и канцер, посматрамо као синдроме чији су узроци и манифестације мултифакторијални и готово увек праћени променама у редокс хомеостазу и метаболизму.

У овој докторској дисертацији испитивано је редокс-метаболичко репрограмирање у карциному дојке жена у парним биопсијама туморског и асоцираног масног ткива дојке које представља доминантну микросредину за његов развој, посматрајући ова два ткива и њихову

комуникацију као један комплексан псеудо-орган. Будући да епидемиолошке и молекуларно биолошке студије указују на чврсту везу између карцинома дојке и гојазности, а да су молекулски механизми који стоје у основи овог феномена махом непознати, у истраживање је укључен и овај фактор. У дисертацији је истраживан карцином дојке код пременопаузалних жена који се последњих деценија карактерише повећаном инциденцом, отежаном детекцијом и показује већу агресивност и нижу стопу преживљавања у поређењу са постменопаузалним карциномом дојке.

У Уводу докторске дисертације, кандидаткиња на почетку подсећа да је карцином дојке најчешће малигно обољење код жена, истичући да је у Републици Србији стопа морталитета највећа у Европи. Јасно је описана класификација карцинома дојке у односу на менопаузални статус, патохистолошки налаз и хормонални статус, односно присуство хормонских рецептора. Истакнута је веза гојазности и карцинома дојке код пременопаузалних жена и чињеница да је прате бројне контрадикторности и недовољно испитани молекулски механизми. У наставку кандидаткиња даје детаљан преглед досадашњих сазнања метаболичког репрограмирања и значај одржања редокс хомеостазе у малигној трансформацији. Будући да су редокс процеси чврсто спрегнути са метаболизмом и његовим репрограмирањем, у Уводу је дат јасан преглед и појашњене су молекулске основе редокс-сензитивног метаболичког репрограмирања. Поред осталог, истакнути су и описани молекулски механизми деловања кључних транскрипционих и фактора који регулишу метаболичке процесе укључене у регулацију овог интерактивног процеса (Nrf2, *енг.* Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2; PGC-1 α , *енг.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; АМПК, *енг.* AMP-activated protein kinase). Дат је и преглед досадашњих сазнања њихове улоге у канцеру, са посебним освртом на канцер дојке. На основу таквог приступа, кандидаткиња даље у Уводу појашњава значај туморске микросредине, нарочито у канцеру дојке са хетерогеном ћелијском популацијом, специфичном комуникацијом међу њима и масним ткивом где адипоцити чине њену главну компоненту. Истакнута је важност познавања метаболичке симбиозе између канцерских ћелија и придружених адипоцита. Наиме, посматрајући масно ткиво као ендокрини и као метаболички активан орган, кандидаткиња описује системске и локалне утицаје гојазности на туморску микро средину у карциному дојке. Као логично сумирање свих ових процеса, већ у Уводу се назире идеја где се канцерско ткиво и њему придружено масно ткиво посматрају као јединствен орган, следствено 100 година старој Варбурговој идеји о метаболичком репрограмирању тумора и туморском ткиву као органу.

У поглављу **Циљеви**, кандидаткиња је јасно дефинисала предмет и основне циљеве истраживања. Основни циљ докторске дисертације био је испитивање редокс и метаболичког репрограмирања туморског и придруженог масног ткива дојке *in vivo* код нормално ухрањених и гојазних пременопаузалних жена са бенигним тумором дојке типа фиброаденом, односно малигним тумором дојке типа инвазивни дуктални карцином: луминални тип А, ER⁺/PR⁺/HER2⁻ (естроген рецептор позитиван, прогестерон рецептор позитиван и рецептор хуманог епидермалног фактора раста 2 негативан). Као специфичне циљеве, Анђелика Калезић наводи: карактеризацију редокс и метаболичког профила туморског и масног ткива дојке; идентификацију и функцијски аспект кључних метаболита и метаболичких путева који могу бити одговорни за развој малигног фенотипа; карактеризацију транскрипционих и редокс-метаболичких регулаторних фактора одговорних за репрограмирање туморског и масног ткива и испитивање координације редокс и метаболичког одговора канцерских ћелија и њима придружених адипоцита на ћелијском нивоу.

У поглављу **Материјал и методи** приказани су и детаљно описани коришћени методи, дизајн студије и селекција пацијенткиња. Наиме, пременопаузалне жене са тумором дојке су на основу малигнитета (патохистолошког налаза) и степена ухрањености подељене у четири групе: 1. нормално ухрањене са бенигним тумором, 2. гојазне са бенигним тумором, 3. нормално ухрањене са малигним тумором и 4. гојазне са малигним тумором дојке. Са аспекта малигнитета, за студију су одабране пацијенткиње са луминалним типом А инвазивног дукталног карцинома дојке, док су жене са бенигним туморима типа фиброаденома служиле као контроле.

Као критеријум за степен ухрањености коришћен је индекс телесне масе (*енг.* Body mass index, BMI) израчунат као однос телесне масе у килограмима и квадрата висине у метрима. Жене са вредношћу BMI < 25 kg/m² сматране су нормално ухрањеним, а жене са BMI ≥ 25 kg/m² прекомерно ухрањеним и гојазним.

Од свих пацијенткиња су приликом рутинских оперативних захвата под балансираном општом анестезијом узете парне биопсије туморског и масног ткива дојке. Том приликом, један део узорка је фиксиран за микроскопске анализе, док је други део узорка залеђен на - 80 °C за изолацију и анализу ДНК, РНК и протеина. Истраживање је одобрено од стране Етичког одбора Института за онкологију Војводине, Сремска Каменица, број: 4/19/1-1486/2-13.

Посебно је битно истаћи адекватно коришћење целог спектра различитих методолошких приступа у дисертацији. Наиме, коришћене су: спектрофотометријске методе за одређивање ензимске активности; имуноцитохемијске, за одређивање присуства и локализације протеина; Western blot, за присуство и квантификацију специфичних протеина и изоформи; RT-PCR (*енг.* real time-polymerase chain reaction), за праћење генске експресије; методе конфокалне микроскопије.

Такође, кандидаткиња детаљно истиче специфичне методе за статистичку обраду резултата које је користила у дисертацији.

У поглављу **Резултати**, кандидаткиња добијене експерименталне податке класификује у логично организоване целине, јасно графички и илустративно приказује, уз примену одговарајуће статистичке обраде. У поглављу **Дискусија**, Анђелика Калезић тумачи резултате и пореди са досадашњим научним сазнањима о редокс-метаболичком репрограмирању туморског и асоцираног масног ткива дојке код нормално и прекомерно ухрањених пременопаузалних пацијенткиња са бенигим и малигним туморима.

Ради бољег сагледавања, комисија анализира најинтересантније резултате из ова два поглавља, делећи их у одговарајуће функционе целине.

На почетку, кандидаткиња дискутује резултате који се односе на новоуспостављене редокс профиле у туморском и масном ткиву дојке. Будући да су досадашњи литературни подаци који се односе на промене активности и протеинске експресије ензима антиоксидативне одбране контрадикторни, те да уз то нема података паралелног праћења промена у туморском и асоцираном масном ткиву, кандидаткиња се одлучила за имунохистохемијски приступ. На тај начин се добија јаснија слика присуства, ткивне дистрибуције и ћелијске локализације и превазилазе проблеми хетерогености експресије на транслационом и посттранслационом нивоу, који између осталог проистичу из ћелијске хетерогености карцинома дојке. Резултати имунохистохемијског праћења кључних ензима антиоксидативне одбране: CuZn- и MnSOD (*енг.* Superoxide dismutase), каталазе и GSH-Px (*енг.* Glutathione peroxidase) то потврђују.

Наиме, канцерске ћелије у малигном туморском ткиву имају значајно јачи интензитет имунопозитивне реакције на CuZnSOD, MnSOD, каталазу и GSH-Px у односу на бенигно туморско ткиво дојке. Значај овог резултата кандидаткиње је што су ово први подаци о експресији и ћелијског локализацији ензима антиоксидативне одбране у карциному дојке код нормално ухрањених и гојазних пременопаузалних жена. Шта више, малигно туморско ткиво се карактерише високом експресијом ензима антиоксидативне одбране, независно од гојазности. Ови резултати указују да су канцерске ћелије, независно од системских и локалних утицаја гојазности на туморску микросредину, изузетно добро адаптиране у контексту елиминације реактивних врста, као и да успостављање нове редокс хомеостазе укључује очување уравнотеженог капацитета за метаболизам како O₂⁻ тако и H₂O₂.

Кандидаткиња даље дискутује резултате у масном ткиву дојке где такође долази до успостављања нове редокс хомеостазе која се карактерише повишеном експресијом ензима антиоксидативне одбране у масном ткиву дојке жена са малигним туморима у поређењу са масним ткивом дојке жена са бенигим туморима. Имунопозитивна реакција на CuZnSOD, MnSOD, каталазу и GSH-Px специфично је локализована у цитоплазми, односно митохондријама адипоцита. Важан резултат до кога је Анђелика Калезић дошла у овом истраживању је да успостављање нове редокс хомеостазе у масном ткиву дојке зависи од

гојазности. Наиме, јачи интензитет имунопозитивне реакције на основне ензиме антиоксидативне одбране уочен је само код нормално ухрањених жена са малигним туморима у поређењу са нормално ухрањеним женама са бенигним туморима, док овакво повећање није уочено код гојазних жена. Интензитет имунопозитивне реакције на основне ензиме антиоксидативне одбране у масном ткиву гојазних жена са малигним туморима је мањи у поређењу са масним ткивом нормално ухрањених жена са малигним туморима и непромењен у односу на масно ткиво дојке гојазних жена са бенигним туморима. Резултати до којих се дошло подржавају концепт двосмерне комуникације између канцерских ћелија и адипоцита која укључује и редокс-сензитивне путеве *in vivo*.

Испитујући експресију и ћелијску локализацију 4-HNE (енг. 4-hydroxynonenal) модификованих протеина, кандидаткиња не налази промене између бенигног и малигног туморског ткива. Непромењен ниво 4-HNE уз повишену ткивну експресију ензима антиоксидативне одбране се дискутује и пре доводи у везу и функцију успостављања нове редокс хомеостазе у малигном туморском ткиву него повећане продукције реактивних врсти и степена липидне пероксидације. Такво мишљење је у складу са новијим подацима где се 4-HNE, поред тога што је маркер оксидативних оштећења, разматра као важан молекул који учествује у редокс-сензитивној сигналној трансдукцији и регулацији редокс хомеостазе.

Супротно, резултати дисертације су показали значајне разлике у профилу 4-HNE модификованих протеина у масном ткиву дојке које су вези како са гојазношћу, тако и малигнитетом. Наиме, интензитет протеинске траке која одговара 4-HNE модификованим протеинима на 40 kDa је већи у масном ткиву гојазних жена са бенигним туморима у односу на масно ткиво нормално ухрањених жена са бенигним туморима, као и у масном ткиву нормално ухрањених жена са малигним туморима у односу на масно ткиво нормално ухрањених жена са бенигним туморима. У масном ткиву гојазних жена са малигним туморима, детектовано је изразито повећање интензитета протеинске траке која одговара протеинима на 25 kDa као и присуство нових трака у поређењу са масним ткивом нормално ухрањених жена са малигним туморима и масним ткивом гојазних жена са бенигним туморима. Такође, имунофлуоресцентном детекцијом је потврђено да је повећање нивоа 4-HNE модификованих протеина специфично локализовано у адипоцитима масног ткива дојке. Шта више, имунофлуоресцентном детекцијом је потврђен повишен ниво 4-HNE модификованих протеина специфично локализованих у адипоцитима масног ткива дојке. Кандидаткиња дискутује ове нове, занимљиве резултате доводећи их у везу са редокс репрограмирањем у малигнитету, посебно код гојазних жена, корелирајући промене са доступним подацима који показују да масно ткиво гојазних особа има инхерентно снижен ниво антиоксидативне одбране који прати повишен ниво 4-HNE. Анђелика Калезић даље дискутује резултате повишене протеинске експресије Nrf2 транскрипционог фактора у малигном туморском ткиву гојазних пременопаузалних жена у поређењу са малигним туморским ткивом нормално ухрањених жена и бенигним туморским ткивом гојазних жена, истичући да се протеинска експресија Nrf2 није разликовала између бенигног и малигног туморског ткива нормално ухрањених жена.

Овај резултат је први пут показан у овој дисертацији и може имати изузетан дијагностички и терапијски значај у персонализованој медицини, будући да су епидемиолошке студије показале чврсту везу између експресије Nrf2 и клиничке прогресије и исхода карцинома дојке. Наиме, висока експресија Nrf2 је у позитивној корелацији са степеном прогресије карцинома дојке, инциденцом метастаза и рецидива, а у негативној корелацији са преживљавањем пацијенткиња. Томе у прилог иду и резултати који указују на диференцијалну експресију Nrf2 између нормално ухрањених и гојазних жена која указује на утицај гојазности на транскрипциону регулацију успостављања редокс хомеостазе у малигном туморском ткиву дојке. Како нису показане разлике у експресији основних ензима антиоксидативне одбране између малигног туморског ткива нормално ухрањених и гојазних жена, разлику у протеинској експресији Nrf2 кандидаткиња дискутује у светлу показатеља финих метаболичких разлика, односно диференцијалног метаболичког репрограмирања у гојазности, имајући у виду да Nrf2 остварује плејотропне улоге у редокс-метаболичком репрограмирању у канцеру које укључују регулацију редокс хомеостазе са једне стране и регулацију енергетског метаболизма са друге.

Супротно разликама у експресији Nrf2 у туморском ткиву, резултати ове дисертације показали су повишену протеинску експресију Nrf2 у масном ткиву нормално ухрањених жена са малигним туморима у поређењу са масним ткивом гојазних жена са малигним туморима и масним ткивом нормално ухрањених жена са бенигним туморима. Овај потпуно нов резултат кандидаткиња дискутује у светлу литературних података из анималних и студија *in vitro* које истичу важност Nrf2 за (пато)физиологију масног ткива истичући да су његове улоге у адипогенези, секрецији адипокина, инсулинској сензитивности и термогеној активацији и даље недовољно испитане.

Анђелика Калезић, дајући јасан преглед резултата метаболичког репрограмирања код жена са пременопаузалним карциномом дојке, детаљно дискутује поједине аспекте, укључујући и метаболизам глукозе као једну од првих биохемијских карактеристика тумора коју је дефинисао Ото Варбург пре око 100 година. Резултати ове дисертације су показали да се и *in vivo*, малигно туморско ткиво пременопаузалних жена карактерише високом протеинском експресијом хексокиназе 2 и снажном колокализацијом са митохондријским маркером VDAC (*енг.* voltage-dependent anion channel) у поређењу са бенигним туморским ткивом и то независно од гојазности. Наиме, хексокиназа 2 је једна од првих предложених метаболичких мета за терапију карцинома дојке. То је праћено и повећаном протеинском експресијом PFK-1 (*енг.* phosphofructokinase-1) и G6PDH (*енг.* glucose 6-phosphate dehydrogenase), што кандидаткиња дискутује као специфичност малигног туморског ткива за метаболичко репрограмирање, када се у великој мери ослања на катаболизам глукозе за продукцију енергије и за одржавање интермедијерног метаболизма и редокс хомеостазе. Са друге стране, показана је већа протеинска експресија хексокиназе 2 и G6PDH у масном ткиву жена са малигним туморима у односу на масно ткиво жена са бенигним туморима, независно од гојазности. Кандидаткиња детаљно дискутује добијене резултате у светлу ткивно специфичног испољавања Варбурговог ефекта, посебно у масном ткиву где је флуks глукозе доминантно усмерен ка пентозофосфатном путу у циљу одржавања редокс хомеостазе и липидног метаболизма. Важан резултат који кандидаткиња детаљно дискутује јесте да је Варбургов ефекат у оба ткива специфично диригован са АМПК, будући да је повишена протеинска експресија АМР и у малигном туморском ткиву у поређењу са бенигним туморским ткивом, независно од гојазности. Исти профил експресије АМПК забележен је и у масном ткиву.

У складу са овим променама и улогом коју има АМПК у регулацији метаболизма кандидаткиња дискутује резултате који указују на смањени флуks угљеника глукозе ка Кребсовом циклусу. Нижа експресија PDH (*енг.* pyruvate dehydrogenase) у малигном туморском ткиву у односу на бенигно туморско ткиво дојке, независно од гојазности, која је праћена нижом протеинском експресијом првог ензима Кребсовог циклуса, цитрат синтазе указује на повезаност и комплексност метаболичког ремоделирања. Насупрот томе, супротне промене су детектоване у масном ткиву дојке, посебно код нормално ухрањених жена са малигним туморима. Кандидаткиња дискутује ове по први пут показане резултате у карциному дојке у светлу хипотезе да канцерске ћелије индукују метаболичко репрограмирање у адипоцитима. Такође, недостатак промена у протеинској експресији PDH и цитрат синтазе у масном ткиву гојазних жена са малигним туморима Анђелика Калезић доводи у везу са потенцијалном дисфункцијом митохондрија у гојазности, посебно у условима стреса или повећаних метаболичких захтева који се намећу у малигнитету.

Посебно су интересантни резултати који се односе на протеинску експресију комплекса респираторног ланца и АТП синтазе у малигном туморском ткиву нормално ухрањених и гојазних жена који показују генерално повећање експресије комплекса респираторног ланца и АТР синтазе у малигном туморском ткиву у односу на бенигно туморско ткиво. Специфично, показано је да је протеинска експресија комплекса II, комплекса III и АТР синтазе већа у малигном туморском ткиву у односу на бенигно туморско ткиво, независно од гојазности. То су први резултати у хуманим узорцима карцинома дојке који јасно указују на важност очуване функције митохондрија за одржање малигног фенотипа, што кандидаткиња детаљно дискутује. Наиме, у складу са Варбурговом хипотезом резултати истичу да оксидативна фосфорилација и гликолиза са продукцијом лактата нису међусобно искључиве биоенергетске стратегије, већ

неопходне компоненте јединствене стратегије метаболичког репрограмирања у карциному дојке. Шта више, Анђелика Калезић истиче да се метаболизам митохондрија налази у основи метаболичке пластичности која омогућава синергизам гликолизе и оксидативне фосфорилације и која условљава метаболичку хетерогеност канцерских ћелија како у примарним туморима тако и у метастатским нишама. Резултати дисертације показали су да и масно ткиво дојке такође показује алтерације у физиологији митохондрија како у односу на гојазност тако и у односу на малигнитет. Наиме, показана је виша протеинска експресија комплекса II и комплекса III у масном ткиву дојке нормално ухрањених жена са малигним туморима у односу на масно ткиво нормално ухрањених жена са бенигним туморима, док је протеинска експресија комплекса IV и АТР синтазе виша у масном ткиву дојке жена са малигним туморима у односу на масно ткиво жена са бенигним туморима, независно од гојазности. Ови резултати показују да код жена са карциномом дојке долази до метаболичког репрограмирања масног ткива дојке, које укључује молекулске промене на нивоу митохондрија.

Будући да специфични онкомаболити имају важну улогу у метаболизму тумора, кандидаткиња је посебну пажњу посветила изучавању лактата као онкомаболита од изузетне функционалне важности, који доприноси не само одржавању континуитета гликолизе, већ служи као супстрат за оксидативни метаболизам и синтезу биомолекула, а такође учествује у регулацији генске експресије и редокс хомеостазе. Поред тога, измењени метаболизам лактата се доводи у везу са агресивношћу, метастатским потенцијалом и последично стопом преживљавања пацијенткиња, а користан је биомаркер у дијагностици и терапији карцинома дојке. Кандидаткиња је поред тога, различитим методама пратила и детаљно дискутовала промене лактат дехидрогеназе (*енг.* lactate dehydrogenase, LDH) и монокарбоксилатних транспортера (*енг.* monocarboxylate transporter, MCT). Резултати ове дисертације су показали вишу концентрацију лактата у малигном туморском ткиву нормално ухрањених жена у односу на бенигно туморско ткиво нормално ухрањених жена. Са друге стране, није показана разлика у концентрацији лактата између малигног и бенигног туморског ткива код гојазних жена, док је концентрација лактата у малигном туморском ткиву гојазних жена нижа у односу на малигно туморско ткиво нормално ухрањених жена. Ово су први подаци који описују разлике у концентрацији лактата у малигном туморском ткиву дојке у односу на гојазност.

Испитујући промене у протеинској експресији мономера LDH Анђелика Калезић показује да је већу протеинску експресију LDHA и мању протеинску експресију LDHB у малигном туморском ткиву у односу на бенигно туморско ткиво, независно од гојазности. Супротне промене у експресији мономера LDH подржавају промену у профилу експресије изоензимских форми LDH. Наиме, кандидаткиња показује повећање заступљености изоформе LDH4 на рачун смањења заступљености изоформи LDH1 и LDH2 у малигном туморском ткиву у односу на бенигно туморско ткиво. У дискусији се истиче да је висока концентрација лактата у малигном туморском ткиву нормално ухрањених жена доминантно последица промена у протеинској експресији мономера LDH, као и у последичној промени у експресионом профилу изоформи LDH, будући да нису забележене разлике у активности укупне LDH.

Дискутујући резултате метаболизма лактата у масном ткиву дојке, кандидаткиња истиче они представљају слику у огледалу у односу на профил промена који је описан у туморском ткиву. Док је у малигном туморском ткиву детектовано повећање концентрације лактата код нормално ухрањених жена, у масном ткиву нису детектоване разлике у концентрацији лактата. Насупрот томе, показана је већа активност укупне LDH у масном ткиву нормално ухрањених жена са малигним туморима у односу на масно ткиво нормално ухрањених жена са бенигним туморима, док нису забележене разлике у активности укупне LDH код гојазних жена са бенигним, односно малигним туморима дојке. Повећање активности укупне LDH у масном ткиву нормално ухрањених жена са малигним туморима је потенцијално последица финих промена у активности појединих изоформи LDH будући да је забележен већи интензитет протеинских трака које одговарају изоформама LDH2 и LDH3 у масном ткиву нормално ухрањених жена са малигним туморима у односу на масно ткиво нормално ухрањених жена са бенигним туморима, док нису забележене разлике у протеинској експресији мономера LDHA и LDHB. Анђелика Калезић истиче да допринос масног ткива метаболизму лактата у туморској

микросредини може бити веома значајан како са аспекта продукције тако и са аспекта оксидације лактата. Са једне стране, адипоцити представљају једно од главних места продукције лактата у организму а са друге стране адипоцити су осетљиви на екстрацелуларну сигнализацију лактатом. Имунохистохемијском анализом LDH мономера, кандидаткиња дискутује добијене резултате који дају јаснију слику о метаболичкој кооперацији туморског и асоцираног масног ткива. Најкраће сажето, поред тога што је дошла до потврде претходних резултата, кандидаткиња иде корак даље указујући да асиметрични профил експресије LDH мономера на инвазивном фронту тумора, LDHA у канцерским ћелијама и LDHB у адипоцитима додатно илуструје могућност метаболичке кооперације засноване на метаболизму лактата.

Како би ближе окарактерисала „лактатом дириговану метаболичку кооперацију“ између канцерских ћелија и адипоцита, кандидаткиња детаљно анализира и дискутује резултате протеинске експресије, ткивне дистрибуције и ћелијске локализације монокарбоксилатних транспортера одговорних за транспорт лактата и пирувата. У дисертацији показана је мања протеинска експресија MCT1 и MCT4 у малигном туморском ткиву у односу на бенигно туморско ткиво и то специфично код нормално ухрањених жена, док се протеинска експресија MCT1 и MCT4 није разликовала између малигног и бенигног туморског ткива код гојазних жена. Разлике у експресији монокарбоксилатних транспортера у малигном туморском ткиву између нормално ухрањених и гојазних жена кандидаткиња дискутује са показаним разликама у метаболизму лактата и гликогена. Наиме, малигно туморско ткиво нормално ухрањених жена одликује се израженим депозицијама гликогена у цитоплазми канцерских ћелија, високом протеинском експресијом GSK 3 (*енг. glycogen synthase kinase 3*) и високом ткивном концентрацијом лактата, што на молекуломском нивоу указује на снажну индукцију гликолитичког фенотипа. Анђелика Калезић истиче да смањена експресија монокарбоксилатних транспортера која је показана код нормално ухрањених жена може представљати још један од механизма који канцерским ћелијама омогућава метаболичку пластичност у контексту симултане стимулације гликолизе и оксидативне фосфорилације. Насупрот смањеној протеинској експресији MCT1 у малигном туморском ткиву нормално ухрањених жена, кандидаткиња истиче значај повећања протеинске експресије MCT1 у масном ткиву дојке нормално ухрањених и гојазних жена са малигним туморима у односу на масно ткиво жена са бенигним туморима.

Имунохистохемијском анализом, кандидаткиња је дошла до јасније слике у вези експресије, ткивне дистрибуције и ћелијске локализације монокарбоксилатних транспортера. Показана је асиметрична локализација MCT1 и MCT4 у туморском, односно масном ткиву. Важан резултат Анђелике Калезић је да се имуноекспресија MCT4 у канцерским ћелијама постепено повећава од центра туморске масе ка инвазивном фронту тумора, док се имуноекспресија MCT1 у адипоцитима постепено повећава од удаљеног масног ткива ка инвазивном фронту тумора. Кандидаткиња, дискутујући ове резултате заједно са показаним повећањем имуноекспресије LDHA у канцерским ћелијама и повећањем имуноекспресије LDHB у адипоцитима указују на потенцијалан, лактатом диригован механизам кооперације између канцерских ћелија и адипоцита који су у блиском физичком контакту.

Важно је истаћи резултате који се односе на измењен метаболизам липида у карциному дојке, који доприносе разјашњавању утицаја гојазности на репрограмирање метаболизма липида и илуструју метаболичку кооперацију засновану на метаболизму липида између канцерских ћелија и адипоцита. Кандидаткиња истиче да стимулисана липолиза у адипоцитима подржава β -оксидацију масних киселина у канцерским ћелијама, посебно у гојазности, што подржава хипотезу индуковане липолизе у малигнитету. Шта више, кандидаткиња истиче да је у масном ткиву дојке повећана синтеза масних киселина код жена са малигним туморима у поређењу са масним ткивом жена са бенигним туморима, независно од гојазности. Ове промене указују на кооперацију метаболичког репрограмирања између туморског и масног ткива и на нивоу метаболизма липида.

Пратећи митохондријску динамику, Анђелика Калезић дискутује резултате који показују да је број копија митохондријске ДНК у малигном туморском ткиву мањи у односу на бенигно

туморско ткиво и код нормално ухрањених и код гојазних жена. Даље, кандидаткиња истиче да резултати указују на комплексну везу између броја копија митохондријске ДНК и транскрипционе активности митохондријског генома, будући да нису показане разлике у транскрипционој активности између бенигног и малигног туморског ткива дојке. Ове резултате прати и смањена протеинска експресија PGC-1 α (*енг.* peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha) у малигном туморском ткиву у поређењу са бенигним туморским ткивом код нормално ухрањених и гојазних пременопаузалних жена, при чему је експресија PGC-1 α такође мања у бенигном туморском ткиву гојазних жена у поређењу са бенигним туморским ткивом нормално ухрањених жена. Кандидаткиња дискутује детаљно ову комплексну везу транскрипционе регулације метаболичког репрограмирања.

Напослетку, Анђелика Калезић сумира могуће механизме и синергистичко деловање PGC-1 α и Nrf2 транскрипционих фактора доводећи их у везу са укупним редокс метаболичким ремоделирањем, антиоксидативном одбраном и могућим механизмима успостављања редокс хомеостазе у коју је укључен декуплујући протеин 1.

У поглављу **Закључци** детаљно су сумирани добијени резултати из докторске тезе и истакнути најважнији. Они логично следе добро поткрепљену дискусију. Комисија их сажима и овде износи у уопштенијем облику: закључци: у процесу неопластичне трансформације туморско и масно ткиво дојке чине комплексан псеудо-орган у коме долази до успостављања специфичних редокс и метаболичких профила у зависности од системских и локалних утицаја гојазности на туморску микросредину; малигна трансформација се карактерише ткивно специфичним променама редокс хомеостазе где малигно туморско и њему асоцирано масно ткиво поседују значајно различите редокс профиле у односу на респективно бенигно туморско и масно ткиво дојке; синхронизација редокс хомеостазе између масног и туморског ткива је посредована транскрипционим фактором Nrf2, а синхронизоване, паралелне промене у експресији ензима антиоксидативне одбране отварају могућност редокс-сензитивне кооперације између туморског и масног ткива; диференцијална експресија редокс-сензитивних транскрипционих фактора и ензима антиоксидативне одбране између нормално ухрањених и гојазних жена истиче ткивно специфичан утицај гојазности на редокс репрограмирање малигно трансформисаних ткива; малигна трансформација се карактерише ткивно специфичним метаболичким репрограмирањем тј. у малигном туморском ткиву и њему придруженом масном ткиву долази до индукције АМПК зависног Варбурговог ефекта, независно од гојазности; у туморском ткиву, метаболизам глукозе је усмерен ка гликолитичком флуксу са продукцијом лактата и ка пентозофосфатном путу зарад одржавања биоенергетске, биосинтетске и редокс хомеостазе, док је метаболизам глукозе у масном ткиву примарно усмерен ка флуксу пентозофосфатног пута што указује да метаболичко репрограмирање у ткивима дојке води успостављању ткивно специфичног Варбурговог ефекта; синхронизоване, реципрочне промене у експресији ензима и транспортера укључених у метаболизам лактата истичу да овај онкомаболит има важну улогу у дириговању метаболичке кооперације између туморског и масног ткива; малигно туморско и њему придружено масно ткиво дојке показују ткивно специфичне стратегије за репрограмирање оксидативног метаболизма и метаболизма митохондрија; да оксидативни метаболизам има улогу у одржању малигног фенотипа показују промене на нивоу оксидативне декарбоксилације пирувата, Кребсовог циклуса, оксидативне фосфорилације и β -оксидације масних киселина.

Важно је истаћи констатацију кандидаткиње да се у складу са Варбурговим ефектом и снажном индукцијом гликолитичког фенотипа, оксидативна фосфорилација одржава у туморском ткиву захваљујући репрограмирању метаболизма масних киселина. Са друге стране, пораст броја копија митохондријске ДНК, као и протеинске експресије ензима Кребсовог циклуса и оксидативне фосфорилације у масном ткиву указује да је индукција оксидативног метаболизма у основи метаболичког репрограмирања адипоцита у малигнитету, што додатно подржава постојање метаболичке симбиозе између туморског и масног ткива дојке.

Такође, метаболичко репрограмирање у карциному дојке је зависно од системског и локалног утицаја гојазности на туморску микросредину. Малигно туморско ткиво нормално ухрањених жена карактерише се високом концентрацијом лактата, високом експресијом GSK 3

и депозицијама гликогена у цитоплазми канцерских ћелија, док се малигно туморско ткиво гојазних жена карактерише високом експресијом ензима укључених у мобилизацију, β -оксидацију и *de novo* синтезу масних киселина.

На послетку, Анђелика Калезић на основу укупних резултата истиче генерални закључак да код жена са пременопаузалним карциномом дојке долази до редокс-сензитивног метаболичког репрограмирања у малигном туморском ткиву и њему придруженом масном ткиву и будући да ова два ткива карактерише координисано репрограмирање, карцином дојке посматрамо као комплексан псеудо-орган који у процесу туморогенезе еволуира у одговору, како на селективне притиске пореклом из туморске микросредине, тако и системске као што је гојазност.

На крају, у поглављу **Литература** кандидаткиња наводи 327 библиографских јединица које су на прави начин цитиране у тексту дисертације и које садрже најновије податке везане за проблематику коју обрађује.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови објављени у научним часописима међународног значаја:

1. **Kalezić A**, Udicki M, Srdic Galic B, Aleksic M, Korac A, Jankovic A, Korac B (2020), Lactate Metabolism in Breast Cancer Microenvironment: Contribution Focused on Associated Adipose Tissue and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24): 1–13. **IF: 5.924 (2020); M21**
DOI: 10.3390/ijms21249676
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33353120>
2. **Kalezić A**, Udicki M, Srdic Galic B, Aleksic M, Korac A, Jankovic A, Korac B (2021), Tissue-Specific Warburg Effect in Breast Cancer and Cancer-Associated Adipose Tissue-Relationship between Ampk and Glycolysis. *Cancers*, 13(11). **IF: 6.639 (2020); M21**
DOI: 10.3390/cancers13112731
<https://www.mdpi.com/2072-6694/13/11/2731>

Б2. Саопштења са међународног скупа штампана у изводу:

1. **Kalezić A**, Udicki M, Masovic S, Srdic B, Korac A, Jankovic A, Korac B (2018), Redox Status in Breast Tumor and Associated Adipose Tissue - Interplay between Obesity and Malignancy. 19th SFRR-I Biennial Meeting, 4-7 June 2018, Lisbon, Portugal, *Free Radical Biology and Medicine*, 120: S86. **M34**
2. **Kalezić A**, Udicki M, Masovic S, Srdic B, Korac A, Jankovic A, Korac B (2018), Relation of obesity to redox regulation and metabolic reprogramming in premenopausal breast cancer. Fourth International Congress of Serbian Society for Mitochondrial and Free Radical Physiology "Challenges in redox biology", September 28-30th, Belgrade, Serbia. *Book of Abstracts*, p49. **M34**
3. **Kalezić A**, Udicki M, Srdic B, Korac A, Jankovic A, Korac B (2019), Redox and metabolic signatures of premenopausal breast cancer in relation to obesity. SFRR-E Meeting Ferrara 2019 "Redox Homeostasis: From Signaling to Damage", June 19-21, Ferrara, Italy. *Free Radical Biology and Medicine*, 139, S8. **M34**
4. **Kalezić A**, Udicki M, Srdic Galic B, Korac A, Jankovic A, Korac B (2021), AMPK and Nrf2 Drive Redox-Metabolic Reprogramming of Cancer-Associated Adipose Tissue in Breast Cancer. SFRR-E Annual Meeting 2021 "Redox Biology in the 21st Century: A New Scientific Discipline", June 15-18, Belgrade, Serbia, *Free Radical Biology and Medicine*, 177: S76–S77. **M34**
5. **Kalezić A**, Udicki M, Srdic Galic B, Korac A, Jankovic A, Korac B (2021), Redox homeostasis and Warburg effect at the interface of cancer-adipose tissue. 9th International

Conference on Oxidative Stress in Skin Biology and Medicine, September 9-12, Andros, Greece. *Book of Abstracts*, p49. **M34**

6. **Kalezic A**, Udicki M, Srdic Galic B, Korac A, Jankovic A, Korac B (2021), Molecular basis of obesity and cancer. 14th International congress on nutrition: „A place where science meets practice“, November 8-10, Belgrade, Serbia. *Book of Abstracts*, p49. **M34**

Б3. Саопштења са националног скупа штампана у изводу:

1. **Kalezić A**, Udicki M, Srdić Galić B, Korać A, Janković A, Korać B (2019), Veza između gojaznosti i kancera dojke kod premenopausalnih žena. 25. susreti nutricionista “Novi trendovi u ishrani: Značaj upotrebe rezultata naučnih studija u izradi preporuka za ishranu stanovništva”. June 6, Belgrade, Serbia. *Book of Abstracts*, p49. **M62**

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње **Анђелике Т. Калезић** послата је дана **29.03.2022.** на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментори су добили дана **29.03.2022.** Резултати електронске провере докторске дисертације показују да индекс подударности износи 14%. Детаљним увидом у Извештај утврђено је да су појединачна подударања са једним извором у опсегу од 7%, једним извором од 2%, три извора у опсегу од 1%, док су остала подударања мања од 1%. Уочене подударности текста се односе на: Захвалницу у којој је назив пројекта и ресорног министарства, лична имена, поједине речи из описа метода, називе поглавља, стандардне скраћенице и енглеске називе, библиографске податке о коришћеној литератури и њихово навођење у тексту, резултате приказане у раду објављеном из тезе кандидаткиње, на афилијацију и звања чланова комисије, биографију кандидата, изјаву о ауторству, изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада, изјаву о коришћењу, као и коришћење кратких фраза уобичајених у српском језику, што све припада групи нужног подударања и у складу је 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 кандидата **Анђелике Т. Калезић**, под насловом „**Метаболички и редокс профил ћелија тумора и масног ткива дојке пременопаузалних жена: веза са гојазношћу**“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација Анђелике Калезић, под називом: „**Метаболички и редокс профил ћелија тумора и масног ткива дојке пременопаузалних жена: веза са гојазношћу**“, представља не само значајан научни допринос разумевању редокс сензитивних молекулских механизма који се налазе у основи метаболичког репрограмирања туморског и асоцираног масног ткива дојке код пременопаузалних жена, већ надасве један сасвим нови приступ, мултидисциплинаран по својој природи, изучавања молекулских основа карцинома дојке. Окарактерисани профили редокс-метаболичког репрограмирања дају посебан значај овој дисертацији. Сагледавајући карцином дојке као метаболичко обољење, кандидаткиња отвара могућност нових, персоналних приступа у превенцији и лечењу карцинома дојке, модулацијом редокс окружења, метаболизма и исхране, будући да гојазност утиче на ове интегративне процесе. Из тих разлога, ова докторска дисертација доприноси разумевању укупне метаболичке, енергетске и редокс хомеостазе карцинома дојке у туморском и асоцираном масном ткиву. Уплив у детаљније молекулске механизме редокс сензитивне регулације и сигналне трансдукције, даје додатну научну тежину докторској дисертацији Анђелике Калезић.

Познавајући Анђелику Калезић од почетка њене научне каријере, Комисија жели да истакне напредак и зрелост кандидаткиње на свим аспектима компетентности научног рада. Објављени научни радови из докторске дисертације и учешће на научним пројектима то и потврђују, а још више импресивна библиографија кандидаткиње и већ запажена цитираност.

Такође, Комисија истиче још један допринос докторске дисертације, а то је да поред многих одговора које је дала, сагласно сваком правом научном делу, отвара нове истраживачке путеве. Посебно се то односи на оригиналан поглед на туморско и асоцирао масно ткиво, а тиме и карцином дојке, као псеудо-орган, где интерактивном комуникацијом и редокс метаболичким репрограмирањем карцином успоставља своју микросредину.

На основу изложених чињеница у вези докторске дисертације Анђелике Калезић које указују на квалитет и научни допринос постигнутих резултата, имајући у виду да су веома обимни задаци постављени у циљу овог истраживања испуњени и верификовани кроз објављене радове у часописима међународног значаја, Комисија са посебним задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и омогући Анђелики Калезић да јавно одбрани своју докторску дисертацију.

Београд, 11. април, 2022. год.

Комисија:

др Александра Кораћ, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Биљана Срдић Галић, редовни професор
Универзитет у Новом Саду-Медицински факултет

др Милица Лабудовић Боровић, ванредни професор
Универзитет у Београду-Медицински факултет