

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 14.06.2022. године, прихваћен је извештај ментора др Николе Танића о урађеној докторској дисертацији **Мирјане Првановић**, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, Београд, Република Србија, под насловом **„Анализа експресије кључних молекула PTEN/PI3K/mTOR сигналног пута и ABC транспортера код троструко негативних карцинома дојке и њихова повезаност са хистопатолошким и клиничким параметрима“** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. **др Душанка Савић Павићевић**, редовни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет
2. **др Горан Брајушковић**, редовни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет
3. **др сци. мед. Зорка Миловановић**, научни саветник, Институт за онкологију и радиологију Србије
4. **др Светислав Татић**, редовни професор, Универзитет у Београду, Медицински факултет
5. **др Татјана Ивковић Капицл**, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду, Медицински факултет

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Мирјане Првановић** под насловом **„Анализа експресије кључних молекула PTEN/PI3K/mTOR сигналног пута и ABC транспортера код троструко негативних карцинома дојке и њихова повезаност са хистопатолошким и клиничким параметрима“** садржи следеће делове: Насловну страну на српском и енглеском језику, Страну са подацима о менторима и члановима Комисије, Захвалницу, Сажетак докторске дисертације на српском и енглеском језику (Резиме, Кључне речи, Научна област и Ужа научна област), Листу скраћеница, Садржај и текст дисертације по одговарајућим поглављима, као и прилоге: Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истовестности штампане и електронске верзије дисертације и Изјаву о коришћењу. Докторска дисертација написана је на **101 страну** куцаног текста прореда 1, величине слова 12 пт, садржи **28 слика, 17 табела, 26 графикона, 162 литературних цитата**, и подељена је у седам поглавља: **УВОД** (28 страна), **ЦИЉ РАДА** (1 страна), **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** (13 страна), **РЕЗУЛТАТИ** (37 страна), **ДИСКУСИЈА** (7 страна), **ЗАКЉУЧАК** (1 страна) и **ЛИТЕРАТУРА** (14 страна).

Експериментални део рада у оквиру докторске дисертације урађен је Институту за онкологију и радиологију Србије, на Одељењу за цитологију и патохистологију и у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић” – Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду.

Анализа докторске дисертације

Докторска дисертација обухвата седам уобичајених поглавља.

У **Уводу** ове докторске дисертације приказана је класификација карцинома дојке са јасном дефиницијом троструко негативних (TNBC) карциномима дојке чија је анализа била предмет ове докторске тезе. TNBC су тумори који не експримирају рецепторе за естроген (ER), прогестерон (PR) и хумани епидермални фактор раста 2 (HER2). У овој тези су концизно представљени бројни епидемиолошки подаци, различити фактори ризика, као и клиничке и хистопатолошке карактеристике TNBC са акцентом на њихову резистенцију на терапију. Обзиром да је PTEN/PI3K/AKT/mTOR сигнални пут (PAM) најчешће оштећен сигнални пут у троструко негативним карциномима дојке, описани су молекуларно-генетички механизми канцерогенезе са посебним освртом на улогу *PTEN* тумор супресор гена као главног контра регулатора овог сигналног пута. Кандидат у овом сегменту концизно описује механизме инактивације *PTEN* тумор супресор гена са освртом на губитак хетерозиготности (LOH) као претпостављени најчешћи механизам инактивације. У уводу је дат и значај кључних молекула PAM сигналног пута, PTEN-а, PI3K и mTOR протеина. Кандидат у овом сегменту тезе, даје јасан увид у проблем резистенције на терапију која представља један од кључних разлога неуспеха у лечењу пацијенткиња оболелих од TNBC. У уводу је, такође, дат опис ABC фамилије мембранских транспортера чији су чланови одговорни за ефлукс бројних хемиотерапеутика због чега се и доводе у везу са феноменом резистенције на терапију. Посебан акценат стављен је на мембрански транспортер ABCB1 (MDR1) чија улога у резистенцији на терапију карцинома дојке, првенствено TNBC, још увек није јасна.

У поглављу **Циљеви рада**, су јасно, компетентно и концизно наведени циљеви овог истраживања. Основни циљ докторског рада био је анализа статуса и улоге PTEN/PI3K/AKT/mTOR сигналног пута и MDR1 протеина у прогресији троструко негативних карцинома дојке и резистенцији на терапију. У складу са јасно дефинисаним општим циљем, дефинисани су конкретни под-циљеви овог докторског рада: утврђивање повезаности експресије PTEN, PI3K и mTOR протеина са хистопатолошким и клиничким параметрима (величина тумора, хистолошки градус, статус регионалних лимфних њворова и статус удаених лимфних чворова и појаву метастаза) и преживљавање оболелих (укупно преживљавање и преживљавање без знакова болести); утврђивање статуса *PTEN* тумор супресор гена анализом LOH-а и испитивање међузависности делеције *PTEN* гена са хистопатолошким параметрима (величина тумора, хистолошки градус, статус регионалних лимфних њворова и статус удаљених лимфних чворова и појаву метастаза) и преживљавање оболелих (укупно преживљавање и преживљавање без знакова болести); утврђивање делеционог статуса *PTEN* гена у односу на статус експресије PTEN протеина и у односу на експресиони статус PTEN, PI3K и mTOR протеина; утврђивање потенцијалне зависности нивоа експресије MDR1 протеина у односу на хистопатолошке параметре (величина тумора, хистолошки градус, статус регионалних лимфних чворова и статус

удаљених лимфних чворова и појаву метастаза) и преживљавање оболелих (укупно преживљавање и преживљавање без знакова болести), и утврђивање међузависности експресионог статуса MDR1 протеина, делеције *PTEN* тумор супресор гена и експресије кључних молекула PTEN/PI3K/AKT/mTOR сигналног пута.

У поглављу **Материјал и методе** дат је јасан преглед клиничко-хистопатолошких карактеристика оболелих од карцинома дојке укључених у ову студију као и адекватан приказ примењених метода. Као експериментални материјал коришћени су парафински калупи туморског и контролног ER+ ткива дојке. Анализом је обухваћено 116 примарних карцинома дојке – 70 TNBC и 46 ER+. Геномска ДНК из исечака парафинских калупа ER+ карцинома дојке изолована је стандардном процедуром фенол-хлороформске екстракције, док је геномска ДНК из исечака TNBC изолована комерцијалним кит-ом Кара Biosystems Express Extract Kit (Кара Biosystems, Wilmington, MA, SAD). Делециони статус *PTEN* гена утврђен је методом квантитивног PCR–а у реалном времену базираном на TaqMan технологији и методом диференцијалног PCR–а. Ниво експресије ER, PR, HER2, PTEN, PI3K, mTOR и MDR1 протеина одређен је семиквантитативном имунохистохемијском методом на исечцима парафинских калупа коришћењем одговарајућих зечијих или мишијих моноклонских антитела и визуелизацијом протеинске експресије применом кит-а, Dako Envision System + HRP (ДАКО, Копенхаген, Данска). За статистичку обраду података примењени су Фишеров тест, Хи-квадрат тест и Спирманов тест корелације рангова. За приказ укупног преживљавања коришћена је Kaplan-Meier продукт-лимит метода, а за њихов опис, медијане Survival Analysis уз 95% интервал поверења. За тестирање разлика у укупном преживљавању коришћен је Log-rank тест.

У поглављу **Резултати** јасно и прегледно су изнети резултати истраживања подељени у пет главних целина. Експериментални резултати приказани су табеларно и графички.

У првој целини представљени су резултати имунохистохемијске детекције PTEN, PI3K и mTOR и MDR1. У другој целини изнети су резултати упоредне анализе клиничких и хистопатолошких параметара и исхода болести PTEN, PI3K и mTOR протеина. У оквиру овог одељка утврђена је смањена/одсутна експресија PTEN протеина и повећана експресија PI3K и mTOR протеина. Слично томе, добијеним резултатима показано је да је ниска експресија PTEN протеина у асоцијацији са високом експресијом PI3K и mTOR протеина и краћим периодом преживљавања оболелих.

Трећа целина обухватала је анализу губитка хетерозиготности *PTEN* гена. У оквиру овог одељка утврђено је да су делеције *PTEN* гена значајно чешће код TNBC него код ER+ тумора. Са друге стране, показано је да губитак оба алела *PTEN* гена (хомозиготне делеције) утиче на агресивније понашање тумора и лошију прогнозу болести. Показано је да хомозиготне делеције утичу на краће преживљавање оболелих.

У четвртој целини, представљени су резултати анализе протеинске експресије MDR1 транспортера. Експресија транспортера била је изузетно снажна код TNBC и уједно значајно виша у поређењу са ER+ туморима дојке. Осим тога, у овом раду, висока експресија MDR1 транспортера доводи се у везу са узнатредовалом метастатском болешћу TNBC тумора. Са друге стране, експресиони статус MDR1 транспортера није доведен у асоцијацију са релевантним клиничко-хистопатолошким параметрима истог типа карцинома.

У петој целини, кандидат је показао да експресиони статус PTEN, PI3K и mTOR протеина није у корелацији са експресијом MDR1 proteina.

У поглављу **Дискусија** изнето је тумачење добијених експерименталних резултата, као и њихово поређење са подацима из литературе. Цело поглавље логично прате изнете резултате. Посебно је истакнуто, да су пацијенткиње оболеле од троструко негативних карцинома дојке са фенотипом смањене/одсутне експресије PTEN протеина и истовремено, повећане експресије PI3K и mTOR протеина имале значајно краће време преживљавања и значајну склоност ка појави регионалних и удаљених метастаза. По свему судећи, постоји значајна смањена/одсутна експресија PTEN протеина код пацијенткиња оболелих од троструко негативних карцинома дојке уз краће време преживљавања као и повећана експресија PI3K и mTOR протеина у односу на величину тумора, лимфонодално ширење тумора и узрапредовали стадијум болести. Хомозиготне делеције *PTEN* гена имају кључну улогу у развићу агресивнијих форми тумора дојке. Значајну улогу има и корелација делеције *PTEN* гена са смањеном/одсутном експресијом PTEN протеина. Губитак *PTEN* тумор супресор гена и висока експресија PI3K и mTOR протеина повезани са лошим исходом болести. Потребно је истаћи експресију MDR1 протеина у корелацији са метастатском болешћу. У поглављу дискусија изложени су налази, литературни подаци и чињенице које јасно доприносе разумевању проблема представљених у овој докторској дисертацији. На крају, потребно је истаћи да резултати овог истраживања пружају и нова сазнања о улози будућих потенцијалних молекуларних маркера у троструко негативним карциномима дојке што кандидат јасно образлаже у овом делу тезе. Потенцијални молекуларни маркер метастатске болести и индикатор прогнозе су хомозиготне делеције *PTEN* гена а потенцијални маркер дисеминације болести MDR1 протеин.

У поглављу **Закључци** сумирана су најважнији запажања изведена из експерименталних резултата истраживања спроведених у оквиру докторске дисертације. Закључци су јасно представљени и дају одговоре на постављене циљеве.

На крају докторске дисертације налази се поглавље **Литература** које садржи листу од 162 библиографске јединице. Библиографске јединице су адекватно цитиране у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1 Радови у часописима међународног значаја

1. M21 **Prvanović M**, Nedeljković M, Tanić N, Tomić T, Terzić T, Milosavljević-Djukić I, Maksimović Z, Maksimović Z, Tanić N. Role of PTEN, PI3K and mTOR in Triple-negative breast Cancer. Life. 2021 Nov 17; 11(11):1247

M21 (IF: 3.817)

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34833123/>

2. M21 Nedeljković M, Tanić N, **Prvanović M**, Milovanović Z, Tanić N. Friend or foe: ABCG2, ABCC1 and ABCB1 expression in triple-negative breast cancer. Breast Cancer. 2021 Jan 8. ;28(3):727-736

M21 (IF: 4.239)

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33420675/>

Оцена извештаја о провери оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње **Мирјане Првановић**, број индекса **М3001/2019**, послата је 23.05.2022.године на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио 25.05.2022.године.

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације Мирјане Првановић под насловом **“Анализа експресије кључних молекула РТЕН/Р13К/мTOR сигналног пута и АВС транспортера код троструко негативних карцинома дојке и њихова повезаност са хистопатолошким и клиничким параметрима“**, утврђено је подударње текста од 17% уз искључена преклапања цитата и библиографских података о коришћеној литератури. Детаљном анализом добијеног Извештаја и поклапања по сегментима, уочено је да је појединачно **подударње у већини случајева било мање од 1%**. Највеће поклапање се јавља у делу тезе која се односи на рад истекао из заједничких истраживања са истог пројекта. Поклапања су превасходно потицала од уобичајено коришћених изјава у оквиру докторске дисертације (назива факултета, имена ментора), латинских назива чешће коришћених врста, термина на енглеском језику датих у загради који се односе на техничке називе метода, компанија од којих потиче опрема, биоинформатички софтвери или реагенси, општих места и података и уобичајених фраза карактеристичних за тематику докторске дисертације у области популационе генетике, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8.став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације под насловом **“Анализа експресије кључних молекула РТЕН/Р13К/мTOR сигналног пута и АВС транспортера код троструко негативних карцинома дојке и њихова повезаност са хистопатолошким и клиничким параметрима“**, ауторке Мирјане Првановић, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација Мирјане Првановић, под називом: „**Анализа експресије кључних молекула PTEN/PI3K/mTOR сигналног пута и ABC транспортера код троструко негативних карцинома дојке и њихова повезаност са хистопатолошким и клиничким параметрима**“, представља значајан научни допринос разумевању и изучавању молекуларних основа троструко негативних карцинома дојке. Окарактерисани PTEN/PI3K/mTOR сигнални пут и хомозиготне делеције PTEN-а дају посебан значај овој дисертацији. Сагледавајући троструко негативан карцином дојке и резистенцију на терапију кандидаткиња отвара могућност нових, персоналних приступа у превенцији и лечењу карцинома дојке будући да су делеције PTEN тумор супресор гена потенцијални маркери метастатске болести и добар показатељ прогнозе троструко негативних карцинома дојке. Такође, потенцијални молекуларни маркер дисеминације болести је и висока експресија MDR1 протеина. Из тих разлога, ова докторска дисертација доприноси разумевању троструко негативних карцинома дојке. Уплив у детаљније молекулске механизме даје додатну научну тежину докторској дисертацији Мирјане Првановић.

Познавајући Мирјану Првановић 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.

На основу увида у истраживања и постигнуте резултате, Комисија закључује да су задаци постављени у циљу и програму, који су усвојени приликом прихватања теме за израду докторске дисертације, испуњени и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње Мирјане Првановић под насловом: „Анализа експресије кључних молекула PTEN/PI3K/mTOR сигналног пута и ABC транспортера код троструко негативних карцинома дојке и њихова повезаност са хистопатолошким и клиничким параметрима “ и омогући кандидаткињи јавну одбрану рада.

КОМИСИЈА:

У Београду, 14.06.2022. године.

др Душанка Савић Павићевић, редовни професор,
Универзитет у Београду -
Биолошки факултет

др Горан Брајушковић, редовни професор,
Универзитет у Београду -
Биолошки факултет

др сци. мед. Зорка Миловановић, научни саветник,
Институт за онкологију и радиологију Србије

др Светислав Татић, редовни професор,
Универзитет у Београду -
Медицински факултет

др Татјана Ивковић Капицл, ванредни професор,
Универзитет у Новом Саду-
Медицински факултет