

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 15.6.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Николе Танића и др Гордане Коњевић о урађеној докторској дисертацији **Милице Д. Недељковић**, истраживача сарадника на Институту за онкологију и радиологију Србије, под насловом „**Молекуларно профилисање и карактеризација троструко негативних и хормонски зависних тумора дојке**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Никола Танић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, др Гордана Коњевић, научни саветник Института за онкологију и радиологију Србије – у пензији од 3.12.2017. године, др Наста Танић, виши научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду, др Горан Брајушковић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Гордана Матић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Милице Д. Недељковић** под насловом „**Молекуларно профилисање и карактеризација троструко негативних и хормонски зависних тумора дојке**“ урађена је у Лабораторији за имунологију Института за онкологију и радиологију Србије и у Лабораторији за радиобиологију и молекуларну генетику Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду, уз финансијску подршку Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (пројекат ИИИ41031).

Докторска дисертација је написана на 125 страна и састоји се из следећих поглавља: Увод (28 страна), Циљеви истраживања (2 стране), Материјали и методе (15 страна), Резултати (43 стране), Дискусија (17 страна), Закључци (3 стране) и Литература (17 страна). Дисертација садржи 37 слика и то: 12 у поглављу Увод, 1 у поглављу Материјали и методе и 24 у поглављу Резултати. Дисертација садржи укупно 33 табеле и то: 1 у поглављу Увод, 8 у поглављу Материјали и методе и 24 у поглављу Резултати. Дисертација садржи и 14 уводних страна и то: Насловну страну на српском и енглеском језику, Страну са подацима о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Резиме на српском и енглеском језику, Листу скраћеница 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** ове докторске дисертације приказана је класификација карцинома дојке са јасном дефиницијом троструко негативних (TNBC) и хормонски зависних (ER+) карциномима дојке чија је упоредна анализа била предмет ове докторске тезе. TNBC су тумори који не експримирају рецепторе за естроген (ER), прогестерон (PR) и хумани епидрмални фактор раста 2 (HER2). Хормонски зависни (ER+) су тумори који увек експримирају рецепторе за стероидне хормоне, док је експресија HER2 варијабилна. У овој тези су концизно представљени бројни епидемиолошки подаци, различити фактори ризика, као и клиничке и хистопатолошке карактеристике обе групе карцинома дојке са акцентом на њиховим разликама. Обзиром да генетичке промене које узрокују очигледне разлике у клиничком понашању и особинама ова два типа карцинома дојке нису сасвим разјашњене, наведени су и описани молекуларно-генетички механизми канцерогенезе са посебним освртом на улогу онкогена. У овом одељку истакнут је и значај испитивања амплификације четири потентна онкогена: *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* и *CCND1*, у карциномима дојке. У уводу је дат и преглед тренутно доступних терапијских протокола који се користе у лечење оба наведена типа карцинома дојке. Кандидат у овом сегменту тезе, даје јасан увид у проблем резистенције на терапију која представља један од кључних разлога неуспеха у лечењу карцинома дојке, посебно TNBC. У уводу је, такође, дат опис ABC фамилије мембранских транспортера чији су чланови одговорни за ефлуks бројних хемиотерапеутика због чега се и доводе у везу са феноменом резистенције на терапију. Посебан акценат стављен је на BCRP и MRP1 мембранске транспортере чија улога у резистенцији на терапију карцинома дојке, првенствено TNBC, још увек није јасна.

У поглављу **Циљеви** су јасно, компетентно и концизно наведени циљеви овог истраживања. Основни циљ докторског рада био је анализа амплификационог статуса одабране групе прото-онкогена и анализа протеинске експресије BCRP и MRP1 мембранских транспортера у TNBC и ER+ карциномима дојке. У складу са јасно дефинисаним општим циљем, дефинисани су конкретни под-циљеви овог докторског рада: утврђивање повезаности онкогеног статуса одабране групе прото-онкогена са клиничко-хистопатолошким параметрима и преживљавањем оболелих у две групе карциномима дојке, TNBC и ER+, и утврђивање повезаности нивоа експресије BCRP и MRP1 транспортера са клиничко-хистопатолошким параметрима и преживљавањем оболелих у обе групе карцинома дојке.

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 здравог ткива дојке. Анализом су обухваћена 124 примарна карцинома дојке – 78 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 Капа Biosystems Express Extract Kit (Капа Biosystems, Wilmington, MA, SAD). Амплификациони статус

FGFR1, *c-MYC*, *EGFR* и *CCND1* гена утврђен је методом квантитивног PCR – а у реалном времену базираном на TaqMan технологији и методом диференцијалног PCR – а. Ниво експресије ER, PR, HER2, MRP1 и BCRP одређен је семиквантитативном имунохистохемијском методом на исечцима парафинских калупа коришћењем одговарајућих зечијих или мишијих моноклонских антитела и визуелизацијом протеинске експресије применом кит-а, RE7140-K (Novocastra, Leica Biosystems, Nusloh, Nemačka). 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 четири главне целине. Експериментални резултати приказани су табеларно и графички.

У првој целини представљени су резултати имунохистохемијске детекције експресије ER, PR и HER2 протеина на основу које су узорци разврстани на TNBC и ER+ карциноме дојке.

У другој целини изнети су резултати упоредне анализе клиничких и хистопатолошких параметара два наведена типа карцинома дојке и јасно је показано да су TNBC тумори и већи и агресивнији.

Трећа, највећа, целина обухватала је анализу амплификационог статуса четири одабрана онкогена, *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* и *CCND1*. У оквиру овог одељка утврђено је да је амплификација *c-MYC* онкогена значајно чешћа код TNBC него код ER+ тумора, док је за *CCND1* онкоген уочено управо супротно, односно да је његова амплификација асоцирана са ER+ туморима. Са друге стране, анализом амплификационог статуса *FGFR1* и *EGFR* онкогена, статистички значајна разлика у ове две групе тумора дојке, није детектована. У овој целини, је, такође, показано да је амплификација *c-MYC* онкогена у асоцијацији са највишим хистолошким градусом и високим стадијумом TNBC тумора. Слично томе, детектовано је да је амплификациони стаус *EGFR* онкогена у асоцијацији са највишим хистолошким градусом ER+ тумора. Увећање броја копија *FGFR1* и *CCND1* онкогена није било статистички значајно повезано са клиничко-хистопатолошким параметрима ни TNBC ни ER+ карцинома дојке. У овом одељку урађена је и анализа могућих ко-алтерација за сва четири онкогена како би се утврдило да ли постоји повезаност између њихове амплификације. Показано је да је амплификација *c-MYC* онкогена статистички значајно често праћена амплификацијом *FGFR1* онкогена у TNBC туморима. Ко-амплификација ова два онкогена такође је била асоцирана са високим стадијумом и највишим хистолошким градусом TNBC тумора. Поред тога, детектована су још три онкогена пара са значајним нивоом ко-амплификације: *EGFR/FGFR1* код TNBC, *EGFR/CCND1* код ER+ и *FGFR1/CCND1* исто код ER+ карцинома дојке. На крају треће целине, показано је да амплификациони статус ни једног од анализираних онкогена није утицао на укупно преживљавање оболелих од оба типа карцинома дојке.

У последњој, четвртој целини, представљени су резултати анализе протеинске експресије BCRP и MRP1 транспортера у малигно трансформисаном и здравом ткиву дојке. Експресија оба транспортера била је изузетно снажна код TNBC и уједно значајно виша у поређењу и са ER+ туморима и са здравим ткивом дојке. Истовремено, није било разлике у нивоу експресије ових транспортера између ER+ тумора и здравог ткива дојке. Осим тога, у овом раду, висока експресија BCRP транспортера доводи се у везу са ниским стадијумом TNBC тумора и са бољим укупним преживљавање болесница из групе TNBC. Са друге стране, експресиони статус MRP1 транспортера није доведен у асоцијацију са

релевантним клиничко-хистопатолошким параметрима истог типа карцинома нити је утврђено да утиче на укупно преживљавање оболелих. У овом одељку, такође, кандидат је показано да експресиони статус BCRP и MRP1 транспортера не утиче на ток и исход болести оболелих од ER+ карцинома дојке. На крају, из резултата приказаних у овом одељку се јасно види да амплификациони статус ни једног од онкогена који су анализирани у предходној целини, није утицао на ниво експресије два транспортера, BCRP и MRP1, у оба типа карцинома дојке.

У поглављу **Дискусија** изнето је тумачење добијених експерименталних резултата, као и њихово поређење са подацима из литературе. Цело поглавље подељено је у две целине које логично прате изнете резултате. Посебно је истакнуто, да су резлике у клиничком понашању TNBC и ER+ карцинома дојке највероватније, последица разлика у њиховом генетичком профилу, односно амплификационом статусу одређених онкогена, нарочито *c-MYC* онкогена. Наиме, кандидат наводи да *c-MYC* онкоген, по свему судећи, има кључну улогу у развићу агресивнијих форми тумора дојке. Потребно је истаћи да резултати овог истраживања пружају и нова сазнања о улози BCRP транспортера у троструко негативним карциномима дојке што кандидат јасно одразлаже у овом делу тезе. У поглављу дискусија изложени су налази, литературни подаци и чињенице које јасно доприносе разумевању проблема представљених у овој докторској дисертацији.

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 208 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. Н. Танић, В. Милинковић, Т. Драмићанин, М. Недељковић, Т. Станковић, З. Миловановић, С. Шушњар, В. Милошевић, Б. Шошић-Јурјевић, Р. Џодић, Н. Танић. Amplification of Cyclin D1, C-MYC and EGFR oncogenes in tumor samples of breast cancer patients, *Journal of Medical Biochemistry* (2013), 32:329–336, DOI: 10.2478/jomb-2014-0005. (M₂₃)
<https://content.sciendo.com/view/journals/jomb/32/4/article-p1.xml?rskey=LVC2fA&result=1>
2. М. Недељковић, Н. Танић, Т. Драмићанин, З. Миловановић, С. Шушњар, В. Милинковић, И. Вујовић, Н. Танић. Importance of copy number alterations of FGFR1 and c-MYC genes in triple negative breast cancer, *Journal of Medical Biochemistry* (2018), 37:1–8, DOI: 10.2478/jomb-2018-0012. (M₂₃).
<https://content.sciendo.com/view/journals/jomb/ahead-of-print/article-10.2478-jomb-2018-0012.xml>

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. М. Недељковић, Н. Танић, Т. Драмићанин, И. Стефановић, С. Шушњар, З. Миловановић, Н. Танић. EGFR gene amplification as a prognostic marker in triple-negative breast cancer, V конгрес друштва генетичара Србије, Београд, 28.9. -2.10. 2014. године. (M₃₄)
2. М. Недељковић, Н. Танић, Т. Драмићанин, И. Стефановић, С. Шушњар, З. Миловановић, Н. Танић. Importance of copy number alterations of EGFR and c-MYC genes in triple-negative breast cancer, Други конгрес Српског друштва истраживача рака, Београд, 2-3 октобар. 2015. године. (M₃₄)

Мишљење и предлог Комисије:

Из прегледа објављених резултата научног рада и изложених резултата из докторске дисертације може се закључити да научна активност Милице Недељковић представља значајан допринос расветљавању актуелних проблема везаних за молекуларну патогенезу малигних болести. Милица Недељковић је афирмисани истраживач у области молекуларне биологије малигне ћелије, способна да самостално дефинише научни проблем, а потом креативно и критички приступи његовом истраживању и решавању. У потпуности влада методологијом и савременим истраживачким техникама те, сходно томе, учествује у свим фазама истраживачког рада који је пред њу и групу са којом ради постављен.

Имајући у виду целокупну научну активност, актуелност истраживачке проблематике и значај постигнутих резултата, комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и омогући Милици Недељковић да јавно одбрани докторску дисертацију под насловом „Молекуларно профилисање и карактеризација троструко негативних и хормонски зависних тумора дојке“.

У Београду, 25.07.2018. године.

КОМИСИЈА:

др Никола Танић, научни саветник, Универзитет у Београду –
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Гордана Коњевић, научни саветник, Институт за онкологију и
радиологију Србије – у пензији од 3.12.2017

др Наста Танић, виши научни сарадник, Универзитет у
Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча“

др Горан Брајушковић, ванредни професор, Универзитет у
Београду – Биолошког факултет

др Гордана Матић, редовни професор, Универзитет у
Београду – Биолошког факултет