

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На III редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 14.12.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Бобана Станојевића и др Горана Брајушковића о урађеној докторској дисертацији **Лидије Б. Тодоровић**, истраживача сарадника Института за нуклеарне науке “Винча”, под насловом „Експресија и варијанте гена за туморски супресор *VHL* у папиларним карциномима штитасте жлезде“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Бобан Станојевић, виши научни сарадник, Институт за нуклеарне науке “Винча”, др Горан Брајушковић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Весна Мандушић, виши научни сарадник, Институт за нуклеарне науке “Винча”. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација је написана на 112 страна и садржи 25 слика и графикона, и 25 табела. Уводних страна (Насловна страна на српском и енглеском језику, Страна са информацијама о менторима и члановима комисије, Изјава захвалности, Страна са подацима о докторској дисертацији на српском и енглеском језику, Садржај) има 13 и те стране нису нумерисане. Дисертација се састоји из 7 поглавља: Увод (24 страна, 8 слика, 1 табела), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (16 страна, 1 слика, 3 табеле), Резултати (32 стране, 16 слика, 21 табела), Дискусија (14 страна), Закључци (2 стране) и Литературе (229 референци на 23 стране). На крају дисертације су приложена следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (5 страна, и те стране нису нумерисане).

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **УВОД** свеобухватно је дат преглед података релевантних за сагледавање теоретске основе дисертације и истраживања која се односе на разматрану проблематику. На почетку увода дат је кратак преглед грађе и функције штитасте жлезде (тиреоиде) како би се боље разумела, у наставку приказана, хистолошка класификација малигнух тумора овог органа. Затим су описани инцидент – која је последњих деценија у сталном порасту, морталитет и фактори ризика за појаву карцинома штитасте жлезде. Детаљније су описани карциноми папиларног хистолошког типа, који су предмет ове дисертације, (енгл. *papillary thyroid carcinoma* – РТС), њихове цито-хистолошке карактеристике, прогностички фактори и познате молекуларно генетичке промене и

механизми који леже у основи њиховог настанка и прогресије. Истакнуто је да је упркос великом напретку у идентификацији генетичких промена у карциномима штитасте жлезде и утврђивања фундаменталне улоге одређених сигналних путева, као што је сигнални пут MAPK (RET-RAS-RAF-MAPK), око 30–35% диференцираних тиреоидних карцинома нема ни једну од описаних генетичких промена. Поред тога, иако се папиларни карциноми тиреоиде одликују спорим растом и слабом инвазивношћу, у 20–30% случајева долази до појава локалних рецидива и/или удаљених метастаза, који се могу јавити и више пута током живота. Потреба за поновљеним лечењем, као и повећање шанси за компликације негативно утичу на квалитет живота ових болесника. Прогноза болесника са овим типом карцинома се за сада базира само на клиничко патолошким параметрима као што су старост болесника, величина тумора, степен екстратиреоидног ширења и присуство нодалних и удаљених метастаза, како је описано у Уводу. Овај приступ има високу предиктивну моћ када је у питању ризик од смрти али је знатно мање ефикасан у предикцији ризика од рецидива, што је клинички значајно с обзиром да се рецидиви јављају много чешће од смртог исхода у случају РТС. Зато је молекуларно профилисање РТС, са циљем идентификације биолошких маркера који би допринели ефикаснијој стратификацији болесника са ризиком за прогресију болести од великог клиничког значаја.

У другом делу увода описана су досадашња сазнања о гену *VHL*, почев од његовог открића, структуре и експресије, мутационих промена које су у овом гену детектоване у различитим типовима карцинома, па до функције његовог протеинског продукта – протеина VHL и процеса у којима је он укључен. Посебна пажња посвећена је улози VHL у супресији тумора. Истакнуто је да је у многим малигнитетима, поремећена експресија *VHL* туморског супресора повезана са агресивнијим понашањем тумора, као и да његова улога и значај нису до сада испитивани у РТС.

На крају увода описан је процес РНК интерференције, један од начина пост-транскрипционе регулације експресије гена, који је посредован молекулима малих некодирајућих РНК (микроРНК). Бројне микроРНК имају измењену експресију у туморским ткивима и доприносе процесу неопластичне трансформације кроз регулацију експресије гена који су кључни за овај процес. Једна од микроРНК за које је у многим студијама утврђено да испољава онкогену активност у различитим малигним туморима је микроРНК-92а. Наведени су резултати експерименталних истраживања других група, који су показали да микроРНК-92а може да препозна и веже се за *VHL* транскрипте, доводећи тако до снижења нивоа његове експресије.

У поглављу **ЦИЉЕВИ**, на јасан и концизан начин изнети су циљеви истраживања. Основни циљ студије био је да се утврди да ли су промене у експресији VHL туморског супресора укључене у етиопатогенезу и/или прогресију РТС и да ли би, у складу са тим, VHL могао бити потенцијални кандидат као параметар класификације и прогнозе код болесника са овим типом карцинома. Да би се више сазнало и о механизмима који су укључени у регулацију VHL, још један циљ ове студије био је да се испита да ли су мутациони догађаји у секвенци гена и пост-транскрипциона регулација посредована микроРНК-92а одговорни за промене у експресији VHL. За остварење ових циљева постављени су следећи истраживачки задаци:

1. Да се испита ниво експресије *VHL* иРНК и мутациони статус гена *VHL* у ткивима РТС.
2. Да се утврди да ли постоји повезаност нивоа *VHL* иРНК и мутационог статуса гена *VHL* са клиничким и патохистолошким параметрима, међу којима су старосна доб и пол болесника, хистолошка варијанта, величина тумора, рТ статус, фокални статус тумора, нодални статус, присуство екстратиреоидног ширења, присуство васкуларне инвазије и клинички стадијум.

3. Да се утврди могућа асоцијација нивоа *VHL* иРНК и мутационог статуса гена *VHL* са подацима о мутационом статусу гена *BRAF* и *RAS*, и реаранжманима *RET/PTC* у ткивима РТС, који су добијени у претходним истраживањима на истој групи узорака.
4. Да се испита ниво експресије *VHL* иРНК и протеина у туморском и одговарајућем неизмењеном тиреоидном ткиву.
5. Да се утврди да ли постоји повезаност промена у нивоима експресије *VHL* са клиничким и патохистолошким параметрима.
6. Да се испита ниво експресије микроРНК-92а у ткиву папиларних карцинома тиреоиде и одговарајућем неизмењеном тиреоидном ткиву и да се утврди да ли постоји повезаност са клиничким и патохистолошким параметрима РТС.
7. Да се утврди могућа корелација нивоа експресије *VHL* иРНК/протеина и микроРНК-92а.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** подељено је на 7 подпоглавља у оквиру којих је кандидаткиња описала: 1) начин прикупљања и чувања материјала који је коришћен у овој студији, 2) изолацију молекула ДНК, 3) изолацију молекула РНК, 4) детекцију мутационих промена у гену *VHL*, 5) одређивање нивоа експресије *VHL* иРНК и микроРНК-92а, 6) имунохистохемисјка испитивања и 7) статистичку обраду резултата. Као материјал коришћени су хумани узорци туморског и неизмењеног ткива штитасте жлезде који су прикупљени у сарадњи са Институтом за онкологију и радиологију Србије и Центром за ендокрину хирургију Клиничког центра Србије, уз одобрења Етичких одбора ове две институције. Узорци ткива су добијени као ткива фиксирана у формалину и уметнути у парафин или као свежи пост-оперативни узорци ткива који су непосредно након операције дубоко замрзнути и чувани на -70°C . Изолација молекула ДНК извршена је применом комерцијалног кита *Puregene Genomic DNA purification kit* (Gentra systems, Qiagen, Minneapolis, SAD), у складу са препорукама произвођача. За изолацију молекула РНК из парафинских узорака коришћен је комерцијални кит *Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Ambion, Foster City, CA, SAD), док је за изолацију молекула РНК из свеже замрзнутих ткива коришћен комерцијални реагенс *TRI Reagent Solution* (Ambion, Foster City, CA, SAD) и модификована класична метода изолације молекула РНК по ауторима Chomczynski i Sacchi. У оквиру припреме изоловане ДНК за секвенцирање урађена је реакција ланчаног умножавања (PCR) сва три егзона гена *VHL*, провера специфичности PCR реакције електрофорезом на агарозном гелу и пречишћавање ампликона употребом кита *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Nemačka), са циљем уклањања осталих компоненти PCR реакције. Одређивање нивоа експресије *VHL* иРНК и микроРНК-92а састојало се из два корака. У првом кораку, молекули РНК односно микроРНК су преведени реакцијом реверзне транскрипције у молекуле комплементарне ДНК (енгл. cDNK). За овај корак коришћени су комерцијални китови *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD), *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) и *TaqMan®MicroRNA Reverse Transcription Kit* за микроРНК (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), у складу са препорукама произвођача. Други корак одређивања нивоа експресије циљних молекула био је квантитативни PCR одн. PCR у реалном времену уз примену технологије SYBR Green/EvaGreen за квантификацију *VHL* и TaqMan технологије за квантификацију микроРНК. За израчунавање релативне експресије циљних молекула коришћене су метода релативне стандардне криве и метода $\Delta\Delta\text{Ct}$. Ниво експресије протеина *VHL* одређен је имунохистохемисјком анализом уз употребу мишјег моноклонског антитела (*VHL*, klon G7, sc-17780, Santa Cruz Biotechnology, CA, SAD) и применом високосензитивне и специфичне двостепене индиректне имунохистохемијске технике у којој се користи декстрански полимер за који су директно везана секундарна антитела у великом броју и који је обележен пероксидазом рена *Thermo Scientific UltraVision LP Detection System/HRP Polymer & DAB Plus Chromogen* (TL-060-HD, Lab Vision, CA, SAD).

На крају поглавља Материјал и методе, описане су статистичке методе које су се користиле за обраду података. Обрада је вршена у статистичким програмима SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp. Armonk, NY, SAD) и GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD), који је коришћен и за визуелизацију резултата. Коришћени су непараметријски статистички тестови: *Mann Whitney test*, *Kruskal–Wallis test*, *Fisher’s exact test*, *Spearman’s correlation test* и *Wilcoxon matched pairs*. Значајност асоцијације нивоа експресије испитиваних молекула и клиничко-патолошких параметара анализирана је и методом логистичке регресије. За анализу преживљавања оболелих коришћени су *Kaplan–Meier* метода, као и *Log–Rank test* за поређење преживљавања међу испитиваним групама. У свим тестовима, вредност $P \leq 0,05$ сматрана је статистички значајном.

У оквиру поглавља **РЕЗУЛТАТИ** јасно и прегледно изнети су експериментални резултати, који су, руководећи се постављеним циљевима и фазама истраживања, подељени у пет целина. Резултати су представљени графички, коришћењем табела и илустровани сликама

Прва целина у поглављу Резултати односи се на анализу *VHL* у архивским узорцима РТС ткива и у оквиру ње прво су описане карактеристике групе болесника који су били укључени у прву фазу студије. Затим су приказани резултати анализе нивоа експресије *VHL* иРНК и асоцијација са стандардним клиничко-патолошким параметрима. Ови резултати су показали да је низак ниво експресије *VHL* иРНК значајно повезан са старијом животном доби болесника, присуством екстратиреоидног ширења тумора, присуством удаљених метастаза, вишом рТ категоријом тумора, узнапредовалим клиничким стадијомом и карактеристикама класичног хистолошког подтипа. У оквиру прве целине, приказани су и резултати испитивања асоцијације нивоа експресије *VHL* иРНК са варијантама гена *BRAF*, *RAS* и *RET*. Подаци о варијантама гена односно о *BRAF* и *RAS* мутацијама, као и *RET/PTC* реаранжманима добијени су у претходној студији на истој групи узорака. Резултати испитивања повезаности нивоа експресије *VHL* иРНК са присуством *BRAF* или *RAS* мутација и *RET/PTC* реаранжмана показали су да не постоји значајна повезаност међу њима. Повезаност нивоа експресије *VHL* иРНК са клиничко-патолошким параметрима болесника одн. тумора испитана је методом мултиваријантне логистичке регресије, која је потврдила да су узнапредовали клинички стадијум и класични хистолошки подтип, као и мултифокалност независни предиктори ниског нивоа експресије *VHL* иРНК. У оквиру прве целине приказани су и резултати испитивања асоцијације нивоа експресије *VHL* са преживљавањем болесника са РТС, који указују на то да је низак ниво експресије *VHL* иРНК у туморском ткиву повезан са појавом рецидива и краћим временским периодом без икаквих знакова и симптома болести код болесника након иницијалног лечења. На крају прве целине приказани су резултати испитивања мутационог статуса гена *VHL* који су показали одсуство мутационих промена у кодирајућем региону овог гена.

Друга целина Резултата односи се на анализу нивоа експресије *VHL* иРНК у свеже замрзнутим узорцима туморског и одговарајућег неизмењеног ткива штитасте жлезде. И ова целина почиње описом карактеристика групе болесника који су били укључени у другу фазу студије. Анализа нивоа експресије *VHL* иРНК у туморском ткиву у односу на неизмењено тиреоидно ткиво истог болесника показала је да је код неких болесника *VHL* иРНК у туморском ткиву статистички значајно повишена док је код других болесника значајно снижена. Затим су приказани резултати који показују да је смањење нивоа експресије *VHL* иРНК у значајној корелацији са присуством екстратиреоидног ширења тумора и са инвазијом туморске капсуле од стране тумора.

Трећа целина поглавља Резултати односи се на анализу експресије микроРНК-92а у свеже замрзнутим туморским и неизмењеним тиреоидним ткивима болесника са РТС. Прво су описане карактеристике групе болесника и тумора који су били доступни за ову

анализу. Ниво експресије микроРНК-92а је, као и ниво *VHL* иРНК, код једне групе болесника у туморском ткиву био статистички значајно повишен док је код друге групе болесника био значајно снижен у односу на неизмењено тиреоидно ткиво. Анализа асоцијације нивоа експресије микроРНК-92а са клиничким и патохистолошким параметрима је показала значајну повезаност високе експресије са присуством лимфних нодалних метастаза, а у групи болесника млађих од 45 година старости у тренутку постављања дијагнозе и са мултифокалношћу и инвазијом капсуле. Асоцијација са старошћу болесника се губи у анализи логистичке регресије док је асоцијација са нодалним статусом потврђена регресионом анализом.

Четврта целина резултата односи се на испитивање корелације нивоа експресије *VHL* иРНК и микроРНК-92а. Иако је добијена статистички значајна негативна корелација између нивоа експресије ова два молекула у групи болесника код којих је утврђено присуство васкуларне инвазије од стране тумора, на нивоу целе групе анализираних болесника није добијена статистички значајна корелација.

Пета целина резултата односи се на имунохистохемијско одређивање нивоа експресије протеина *VHL* и *PTC* узорцима. Имунохистохемијска детекција протеина *VHL* показала је да је протеин *VHL* детектабилан и у туморском и у перитуморском ткиву тиреоиде. Разлика у експресији *VHL* у туморском и перитуморском ткиву била је статистички значајна. Међу туморским ткивима највише узорака је показивало јаку или умерену имунореактивност док је међу перитуморским ткивима преовлађивала слаба имунореактивност. Иако су ови резултати у сагласности са резултатима анализе *VHL* на нивоу РНК, није установљена статистички значајна корелација нивоа експресије *VHL* иРНК и протеина, као ни значајна корелација нивоа експресије протеина *VHL* и микроРНК-92а.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, кандидаткиња је критички размотрила и тумачила добијене резултате. Поглавље је подељено у неколико целина које логично прате целине поглавља Резултати. Добијени резултати упоређивани су са резултатима експерименталних студија других истраживача. Посебна пажња посвећена је давању могућих објашњења неконзистентних резултата поређених студија. Поглавље Дискусија доприноси разумевању тумачења резултата личних истраживања допуњених резултатима објављеним у савременој научној литератури.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидаткиња Лидија Б. Тодоровић сумира најважније закључке који произилазе из експерименталних резултата приказаних у докторској дисертацији. На основу добијених резултата изведени су следећи најважнији закључци:

1. Анализом експресије *VHL* иРНК и протеина у узорцима папиларних карциноматиреоиде утврђено је да у току онкогенезе ових карцинома долази до поремећаја експресије *VHL* туморског супресора.
2. Снижена експресија *VHL* иРНК повезана је са клиничким и патохистолошким карактеристикама *PTC* које указују на агресивније понашање. Овај резултат говори у прилог томе да је ниво експресије *VHL* иРНК потенцијални биолошки маркер агресивнијег понашања тумора и потенцијални кандидат као прогностички параметар за стратификацију болесника са *PTC* у групе са различитим ризиком за прогресију болести.
3. У односу на ниво *VHL* иРНК експресије у *PTC* и одговарајућем неизмењеном тиреоидном ткиву, утврђено је постојање две групе болесника – они са сниженом нивоу експресије *VHL* у туморском ткиву. Овај резултат указује на то да ниво експресије *VHL* можда може бити основ за селекцију болесника који би имали бенефит од потенцијалних циљаних антиангиогених молекулских терапија.
4. Одсуство мутационих промена у кодирајућем региону гена *VHL* указује на то да мутације у секвенци овог гена нису чест догађај у патогенези *PTC*. На основу тога,

закључено је да су за промене у експресији VHL у току онкогенезе РТС од већег значаја други регулаторни механизми.

5. Анализом експресије микроРНК-92а у узорцима папиларних карцинома тиреоиде утврђено је да у току онкогенезе ових карцинома долази до поремећаја експресије ове микроРНК. Такође, утврђена је и значајна веза између повишеног нивоа експресије миР-92а и присуства нодалних метастаза код болесника са РТС. Ови резултати указују на могућу улогу микроРНК-92а у патогенези РТС.

6. С обзиром да у главнини испитаних узорака није утврђена значајна корелација нивоа експресије VHL и микроРНК-92а, закључено је да ова микроРНК вероватно нема значајнију улогу у регулацији нивоа експресије овог туморског супресора у патогенези РТС.

На крају ове докторске дисертације налази се поглавље **ЛИТЕРАТУРА** у коме је дата листа библиографских јединица. Она садржи 229 библиографских јединица које су адекватно и на одговарајућим местима цитиране у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Boban Stanojevic, Vladimir Saenko, **Lidija Todorovic**, Nina Petrovic, Vladan Zivaljevic, Ivan Paunovic, Masahiro Nakashima, Shunichi Yamashita, Radan Dzodic. (2014) Low VHL mRNA expression is associated with more aggressive tumor features of papillary thyroid carcinoma. PloS One, Dec 9;9(12):e114511 **M21 IF-3,234**
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0114511>
2. **Todorović L**, Stanojević B, Mandušić V, Petrović N, Živaljević V, Paunović I, Diklić A, Saenko V, Yamashita S. (2018) Expression of VHL tumor suppressor mRNA and miR-92a in papillary thyroid carcinoma and their correlation with clinical and pathological parameters. Med Oncol. Jan 16;35(2):17. **M22 IF- 2,920**
<https://doi.org/10.1007/s12032-017-1066-3>

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Todorovic L**, Stanojevic B, Mandusic V, Petrovic N, Zivaljevic V, Paunovic I, Dimitrijevic B. Quantitative analysis of von Hippel-Lindau messenger RNA expression in thyroid tumor tissue by real time PCR. 1st Belgrade International Molecular Life Science Conference for students. Belgrade, 15-18.01.2015 (31) **M34**

Мишљење и предлог Комисије:

Комисија сматра да је кандидаткиња Лидија Б. Тодоровић у изради дисертације показала висок степен познавања научне основе проблематике, добро је дефинисала циљеве, применила адекватне методе у истраживању и обради добијених резултата које је критички дискутовала, уз исцрпне податке из литературе. Дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме и садржи све елементе прописане за завршену докторску дисертацију. Добијени резултати истраживања приказани у докторској дисертацији у складу су са постављеним циљевима и задацима истраживања а закључци произилазе из добијених резултата. Докторска дисертација Лидије Б. Тодоровић даје оригинални допринос истраживањима у области молекуларне генетике папиларних карцинома штитасте жлезде. По први пут, анализиран је статус туморског супресора *VHL* у папиларним карциномима штитасте жлезде, као и ниво експресије микроРНК-92а, једне од првих микроРНК које су идентификоване као онкогене. Резултати дисертације указују на то да би евалуација нивоа експресије туморског супресора *VHL* могла имати клинички значај у прогнози агресивнијег тока болести код болесника са овим типом карцинома.

На основу укупне оцене дисертације, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Лидије Б. Тодоровић под насловом „Експресија и варијанте гена за туморски супресор *VHL* у папиларним карциномима штитасте жлезде“.

У Београду, 17.12.2018. године.

КОМИСИЈА:

др Бобан Станојевић, виши научни сарадник, Институт
за нуклеарне науке “Винча”, Универзитет у Београду

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

др Весна Мандушић, виши научни сарадник, Институт
за нуклеарне науке “Винча”, Универзитет у Београду