

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.07.2020. године, на основу молбе ментора др Милене Крајновић, научног сарадника Института за нукларне науке „Винча“- Института од националног значаја за Републику Србију и др Горана Брајушковића, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Бојане Р. Кожик**, истраживача сарадника, Института за нукларне науке „Винча“- Института од националног значаја за Републику Србију, под насловом **„Метилациони статус *p16INK4a* и *p14ARF* тумор-супресор гена и присуство мутација *KRAS* онкогена у корелацији са одговором на преоперативну хемиорадиотерапију у локално узнапредовалом карциному ректума човека“**, у саставу: др Милена Крајновић, научни сарадник, Институт за нукларне науке “Винча”- Институт од националног значаја за Републику Србију, др Горан Брајушковић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Славица Кнежевић-Ушај, редовни професор у пензији Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду. 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 је написана на 99 страна, садржи 19 слика и графикона и 27 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, Скраћенице и Садржај) има 13 и те стране нису нумерисане. Дисертација се састоји из 8 поглавља: Увод (18 страна, 8 слика), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (11 страна, 7 табела), Резултати (21 страна, 11 слика, 9 табела), Дискусија (11 страна), Закључци (2 стране), Литературе (324 референце на 21 страни) и Прилога (8 страна, 11 табела). 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).

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **УВОД**, кроз седам целина, свеобухватно је дат преглед података релевантних за сагледавање теоретске основе дисертације и истраживања која се односе на разматрану проблематику. На почетку увода дати су општи подаци који се односе на етиологију и епидемиологију колоректалног карцинома (КРК), а наведени су и фактори ризика, као и најчешћи наследни облици овог малигног обољења. У следећој тематској

целини дат је свеобухватан преглед молекуларне патогенезе колоректалних карцинома, и приказана су различити молекуларни путеви настанка ових тумора (супресорски, мутаторски или метилаторски), који укључују синергистичко деловање генетичких и епигенетичких промена на сваком ступњу прогресије КРК, од бенигнух лезија до малигнух аденокарцинома. Савременим анализама експресије генома дефинисани су консекусузни молекуларни подтипови КРК, који су детаљно описани на крају овог поглавља. Следећа тематска целина садржи посебан осврт на процес метилације молекула ДНК, уз детаљан опис механизма и улоге коју ова епигенетичка модификација има у регулацији транскрипције. Посебано је истакнута улога метилације молекула ДНК у канцерогенези, са акцентом на хиперметилацију промоторских региона појединих гена, с обзиром да је један од предмета истраживања ове докторске дисертације испитивање метилационог статуса тумор-супресорских гена *p16INK4a* и *p14ARF*. У следећој тематској целини издвојен је карцином ректума (КР) као посебан ентитет, јер је показано да се ови карциноми значајно разликују од карцинома колоне, како према етиологији и третману болести, тако и према типу молекуларних догађаја укључених у сам процес канцерогенезе. Затим следи детаљан преглед структуре и функције гена *p16INK4a*, *p14ARF* и *KRAS*, њихова улога у патогенези КРК, међусобне интеракције и заступљеност метилационих, односно мутационих промена у КРК. Следећа тематска целина посвећена је терапијском приступу у лечењу КР, где се прво дефинишу стадијуми болести, а затим предности и мане примене преоперативне хемиоротирације (ХРТ) код оболелих од КР у локално узнапредовалом стадијуму. Одговор на овај терапијски режим је варијабилан, што указује на постојање значајне биолошке хетерогености међу туморима који припадају истом стадијуму, као и на потребу за дефинисањем поузданих предиктивних молекуларних биомаркера у циљу креирања и примене персонализоване терапије. Стога се следећа тематска целина бави потенцијалним предиктивним факторима туморског одговора на преоперативну ХРТ, са посебним освртом на предиктивну и прогностичку улогу имунохистохемијски утврђеног нивоа експресије протеина EGFR, VEGF, Vcl-2 и Ki-67 код КРК. На крају увода наводи се потенцијални клинички значај испитивања епигенетичких (метилација гена *p16INK4a* и *p14ARF*) и генетичких (мутације гена *KRAS*) промена код оболелих од КР.

У поглављу **ЦИЉЕВИ** наведено је шест научних циљева ове дисертације. Прва два циља односила су се на одређивање учесталости метилације гена *p16INK4a* и *p14ARF*, као и учесталости и типова мутација у гену *KRAS* у узорцима туморског ткива претретманских биопсија оболелих од локално узнапредовалог КР. Наредна три циља односила су се на испитивање могуће асоцијације наведених епигенетичких (метилација гена *p16INK4a* и *p14ARF*) и генетичких промена (мутације гена *KRAS*) са: а) клиничко-патолошким параметрима, укључујући: пол и старост испитаника, стадијум болести и локацију тумора; б) имунохистохемијски детектабилним нивоом експресије протеина EGFR, VEGF, Vcl-2 и Ki67 и в) одговором на примењену терапију, током и исходом болести. Као крајњи циљ постављен је задатак да се на основу добијених резултата процени евентуални предиктивни и прогностички значај аберантне метилације гена *p16INK4a* и *p14ARF*, односно мутације гена *KRAS* као биомаркера код овог типа тумора дебелог црева.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** кандидаткиња је детаљно приказала основне податке о пацијентима, односно испитиваним туморским и контролним узорцима укључених у студију. Ретроспективном студијом обухваћено је 63 испитаника оболелих од КР у локално узнапредовалом стадијуму (TNM II и TNM III), који су лечени у Институту за Онкологију „Војводина“ у Сремској Каменици, у периоду од 2006-2010.

године. Узорци за молекуларне анализе су били доступни у виду парафинских исечака ткива, добијених ендоскопском биопсијом ткива ректума при успостављању дијагнозе, а пре самог третмана и операције. Као контролни узорци су коришћени лимфоцити периферне крви здравих особа. У даљем тексту је наведена терапијска процедура након постављања дијагнозе и дат је критеријум за процену одговора на преоперативну ХРТ и класификовање пацијената у групе са повољним или неповољним одговором на терапију. Детаљно су описани и критеријуми на основу којих је имунохистохемијски декетована експресија протеина EGFR, VEGF, Bcl-2 и Ki-67 означена као ниска, односно, висока, што је даље коришћено у анализи резултата. Кандидаткиња затим у овом поглављу описује експерименталне методе коришћене у раду. Детаљно је описан поступак изолације геномске ДНК из парафинских исечака ткива и лимфоцита периферне крви, као и процедура коришћена за проверу квалитета и концентracије изоловане ДНК. Затим је приказан поступак бисулфитне модификације ДНК и квалитативне ПЦР технике специфичне за метилацију (МСП) којом је утврђен метилациони статус промоторског региона гена *p16INK4a* и *p14ARF*. Након тога је детаљно описан поступак за детекцију присуства и типа мутација у 12. и 13. кодону другог егзона гена *KRAS*. Детекција мутација је у сваком узорку након ПЦР амплификације региона од интереса извршена директном методом секвенцирања у сарадњи са Институтом за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду. На крају поглавља је дат и детаљан опис статистичких метода коришћених у обради добијених резултата. Добијени резултати су анализирани одговарајућим статистичким тестовима у лиценцираном статистичком програму Sigma Plot 10.0. У зависности од природе самих варијабли, коришћени су Пирсонов χ^2 -тест, а код нумеричких ограничења таблице 2x2 примењен је Фишеров егзактни тест. За поређење просечних вредности параметарских обележја употребљен је Студентов t-тест за две групе података. За анализу преживљавања коришћена је Каплан-Мајерова метода, као и Log-Rank тест за поређење преживљавања међу испитиваним групама.

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 клиничко-патолошких карактеристика болесника са карциномом ректума, где је наведена просечна старост испитаника, као и процентуалана заступљеност испитаника у односу на пол, стадијум болести, локацију тумора, одговор на терапију, присуство локалних рецидива и/или метастаза и смртни исход. Такође су наведени и резултати имунохистохемијске експресије протеина EGFR, VEGF, Bcl-2 и Ki-67 код испитаника обухваћених студијом.

У следећој целини приказани су резултати испитивања метилационог статуса гена *p16INK4a* и *p14ARF* у узорцима ткива КР. Поред учесталости метилације оба гена у узорцима испитаника обухваћених студијом, приказани су и резултати испитивања повезаности метилационог статуса гена *p16INK4a* и *p14ARF* са клиничко-патолошким и имунохистохемијским карактеристикама, као и са одговором на ХРТ, током и исходом болести. С обзиром да метилациони статус гена *p16INK4a* и *p14ARF* појединачно није утицао на одговор на терапију, на крају ове целине приказани су резултати анализе утицаја истовременог присуства метилације гена *p16INK4a*, односно *p14ARF* у комбинацији са различитим нивоима експресије протеина EGFR, VEGF, Bcl-2 и Ki-67 на одговор на терапију, ток и исход болести. У овим анализама утврђена је статистички значајна асоцијација истовременог присуства метилације гена *p16INK4a*, односно *p14ARF* и повишене експресије протеина VEGF са неповољним одговором на ХРТ. Такође, утврђена је и статистички значајна асоцијација истовременог присуства метилације гена

p16INK4a и повишене експресије протеина EGFR са ређом појавом локалних рецидива и метастаза, док је метилација истог гена у комбинацији са нижом експресијом протеина VEGF и повишеном експресијом протеина EGFR била значајно повезана са повољним одговором на терапију.

Трећа целина резултата односи се на испитивање мутационог статуса гена *KRAS* у узорцима ткива КР. У првом делу ове целине приказана је дистрибуција детектованих мутација у гену *KRAS*, односно учесталост различитих типова мутација детектованих појединачно у кодонима 12 и 13, као и учесталост специфичног типа мутација према типу базне измене у оквиру оба кодона гена *KRAS*. У другом и трећем делу ове целине, приказани су резултати који се односе на повезаност мутационог статуса гена *KRAS* са клиничко-патолошким и имунохистохемијским карактеристикама, односно са одговором на преоперативну ХРТ, током и исходом болести. Показано је да је у комбинацији са повишеним нивоом експресије протеина VEGF и Bcl-2, присуство мутације у гену *KRAS* статистички значајно повезано са неповољним одговором на ХРТ. Такође, утврђена је и статистички значајна асоцијација мутације G12A у 12. кодону гена *KRAS* са повољним одговором на терапију.

Четврта целина резултата односи се на анализу међусобне повезаности метилације гена *p16INK4a*, односно *p14ARF* са мутацијама у гену *KRAS*. Резултати ових анализа су показали да је истовремено присуство метилације гена *p14ARF* и мутације гена *KRAS* статистички значајно повезано са чешћом појавом локалних рецидива и/или метастаза, односно агресивнијим понашањем тумора.

Пета целина резултата односи се на анализу преживљавања. Показано је да појединачни статус гена *p16INK4a*, *p14ARF* и *KRAS* није повезан са укупним преживљавањем оболелих од КР. Међутим, у комбинованим анализама су добијене неке статистички значајне асоцијације. Тако је истовремено присуство метилације гена *p16INK4a* и *p14ARF* и мутације у гену *KRAS* (*p16m/p14m/KRASmut*) било значајно повезано са краћим укупним преживљавањем. Такође, када су у анализу укључени и подаци о имунохистохемијској експресији анализираних протеина, показано је да је истовремено присуство метилације гена *p16INK4a* и високог нивоа експресије протеина VEGF (*p16m/VEGFv*) статистички значајно повезано са краћим укупним преживљавањем. Статистички значајна асоцијација са краћим преживљавањем је показана и код оболелих са истовремено присутном мутацијом у гену *KRAS* и повишеном експресијом протеина VEGF (*KRASmut/VEGFv*), док таква асоцијација није утврђена у случају истовремене анализе метилационог статуса гена *p14ARF* и експресије протеина VEGF. Када су у анализу укључени други имунохистохемијским параметри (EGFR, Bcl-2 и Ki-67) није утврђена ниједна статистички значајна асоцијација.

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. Такође, Бојана Р. Кожик критички описује и главне лимитације своје студије, да би на самом крају пружио увид у будуће перспективе истраживања у области идентификације нових биолошких маркера а и саме патогенезе КР.

Важно је нагласити да је ово прва студија која се бавила комбинованом анализом молекуларних промена у генима *p16INK4a*, *p14ARF* и *KRAS* и нивоа експресије одабраних протеина укључених у процесе неопластичне трансформације (EGFR, VEGF, Bcl-2 и Ki67) и њихове потенцијалне предиктивне и прогностичке улоге код оболелих од КР. Ове чињенице говоре у прилог оригиналности теме докторске дисертације Бојане Р. Кожик.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидаткиња Бојана Р. Кожик сумира најважније закључке који произилазе из експерименталних резултата приказаних у докторској дисертацији. Метилација промоторског региона гена *p16INK4a* и *p14ARF* детектована је у значајном броју испитаника оболелих од КР, што сугерише да епигенетички механизми регулације генске експресије могу имати важну улогу у патогенези овог типа тумора. Мутације у гену *KRAS* детектоване су код трећине испитаника оболелих од КР. Најчешће детектован тип мутације у гену *KRAS* је трансверзија G у T (G12V) на другој позицији кодона 12, што је у складу са изложеношћу регион-специфичним карциногенима. Није детектована статистички значајна асоцијација метилације гена *p16INK4a*, односно гена *p14ARF* и испитиваних клиничко-патолошких и имунохистохемијских параметара код оболелих од КР. Мутација гена *KRAS* је статистички значајно чешће детектована код тумора локализованих у средњем ректуму, док повезаност са осталим клиничко-патолошким и имунохистохемијским параметрима није детектована. Када је анализиран тип мутација, присуство трансверзије G у C (G12A) у 12. кодону гена *KRAS* је статистички значајно повезано са нижом експресијом протеина VEGF и Ki-67. Појединачно гледано, метилациони статус *p16INK4a* нема предиктивни ни прогностички значај код оболелих од КР, али у комбинацији са експресијом фактора VEGF, метилација гена *p16INK4a* је статистички значајно повезана са неповољнијим одговором на ХРТ и краћим укупним преживљавањем. Метилација гена *p16INK4a* је у комбинацији са нижом експресијом протеина VEGF и повишеном експресијом протеина EGFR статистички значајно повезана са повољнијим одговором на ХРТ, док је у комбинацији са повишеном експресијом EGFR, независно од статуса експресије протеина VEGF, метилација гена *p16INK4a* статистички значајно повезана са ређом појавом локалних рецидива и/или метастаза код оболелих од КР. Појединачно гледано, метилациони статус гена *p14ARF* нема предиктивни ни прогностички значај код оболелих од КР, али у комбинацији са истовремено повишеном експресијом протеина VEGF, метилација гена *p14ARF* статистички је значајно повезана са неповољнијим одговором на ХРТ, док асоцијација са укупним преживљавањем није утврђена. Мутациони статус гена *KRAS* засебно посматран нема предиктивни ни прогностички значај код оболелих од КР, али у комбинацији са истовремено повишеним нивоом експресије протеина VEGF и Bcl-2, присуство мутација у гену *KRAS* је статистички значајно повезано са неповољнијим одговором на терапију. У случају истовременог присуства мутације у гену *KRAS* и повишене експресије VEGF, утврђена је и статистички значајна асоцијација са агресивнијим током болести и краћим укупним преживљавањем. Утврђена је статистички значајна асоцијација трансверзије G у C (G12A) у 12. кодону гена *KRAS* са повољнијим одговором на терапију. Истовремено присуство метилације гена *p14ARF* и мутације гена *KRAS* је повезано са значајном чешћом појавом локалних рецидива и/или метастаза, односно са агресивнијим типом тумора. Истовремено присуство метилације гена *p16INK4a* и *p14ARF* и мутације у гену *KRAS* статистички је значајно повезано са краћим укупним преживљавањем. Предложени модел истовремене анализе епигенетичких (метилација гена *p16INK4a* и *p14ARF*) и генетичких промена (мутације гена *KRAS*) и нивоа експресије одабраних протеина укључених у процесе неопластичне трансформације (EGFR, VEGF, Bcl-2 и Ki67) може имати предиктивни и прогностички значај код оболелих од КР.

На крају ове докторске дисертације налази се поглавље **ЛИТЕРАТУРА** у коме је дата листа библиографских јединица. Она садржи 324 библиографске јединице 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. Milena Krajnović, **Bojana Marković**, Slavica Knežević-Ušaj, Ivan Nikolić, Maja Stanojević, Valentina Nikolić, Marina Šiljić, Snežana Jovanović Ćupić, Bogomir Dimitrijević. Locally advanced rectal cancers with simultaneous occurrence of KRAS mutation and high VEGF expression show invasive characteristics. *Pathology Research and Practice*, 2016;212(7):598-603.

M23

(doi: <https://doi: 10.1016/j.prp.2016.02.018>)

2. **Kožik Bojana**, Kokanov Nikola, Knežević-Ušaj Slavica, Nikolić Ivan, Davidović Radoslav, Jovanović-Ćupić Snežana, Krajnović Milena. Methylation status of p16 and p14 genes in locally advanced rectal cancer: potential clinical implication. *Arch Biol Sci*. 2018;70(4):681-90.

M23

(doi: <https://doi.org/10.2298/ABS180316030K>)

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Markovic B**, Knezevic-Ušaj S, Nikolic I, Stanojevic M, Nikolic V, Jovanovic-Cupic S, Krajnovic M. Role of KRAS mutation in the locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. 1st Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students, Belgrade, Serbia, 15-18. January, 2015; p17.

M34

2. **Kožik B**, Kokanov N, Knežević-Ušaj S, Nikolić I, Davidović R, Jovanović-Ćupić S, Krajnović M. Combined analysis of p16 and p14 methylation and VEGF expression could predict more aggressive phenotype of locally advanced rectal cancers. First Congress of Molecular Biologists of Serbia with international participation, Belgrade, Serbia, 20-22. September, 2017; p100.

M34

Провера оригиналности докторске дисертације

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 под насловом „Метилациони статус *p16INK4a* и *p14ARF* тумор-супресор гена и присуство мутација *KRAS* онкогена у корелацији са одговором на преоперативну хемиоррадиотерапију у локално узнапредовалом карциному ректума човека“ кандидаткиње **Бојане Р. Коџик** (Б3022/2012), констатујем да утврђено подударање текста износи 16%.

Увидом у Извештај утврђено је да су подударња највећим делом последица коришћења исте научне терминологије, стандардних лабораторијских протокола и идентичних скраћеница за гене, протеине и коришћене хемикалије, као и у претходно урађеним тезама из исте или сличне области у оквиру исте истраживачке групе. Индекс сличности са свим тезама укупно износи 11% од укупног индекса сличности 16%. До подударња је дошло и услед навођења библиографских података о коришћеној литератури, општих места и података, назива међународних организација, друштава и асоцијација које се баве истраживањем канцера, као и претходно публикованих резултата истраживања кандидаткиње, који су проистекли из њене дисертације, (са појединачним поклапањима мањим од 1%, што укупно износи 5% од укупног индекса сличности 16%).

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, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 17.07.2020.

Ментор

др Милена Крајновић, научни сарадник, Институт за нуклеарне науке “Винча” – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

Мишљење и предлог Комисије:

Комисија сматра да је кандидаткиња Бојана Р. Кожик 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 Бојане Р. Кожик даје оригинални допринос истраживањима у области молекуларне генетике карцинома ректума. Ово је прва студија која се бавила анализом потенцијалног предиктивног и прогностичког значаја епигенетичких (метилација гена *p16INK4a* и *p14ARF*) и генетичких промена (мутације гена *KRAS*) у комбинацији са експресијом одабраних протеина укључених у процес малигне трансформације. Резултати дисертације указују на то да би истовремена анализа датих генетичких, епигенетичких и имунохистохемијских параметара могла да има клинички значај у идентификацији подгрупа оболелих од КР у локално унапредовалом стадијуму, које се међусобно разликују како по одговору на преоперативну хемиордиотерапију, тако и по току и исходу болести.

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 **Бојане Р. Кожик** под насловом „**Метилациони статус *p16INK4a* и *p14ARF* тумор-супресор гена и присуство мутација *KRAS* онкогена у корелацији са одговором на преоперативну хемиордиотерапију у локално унапредовалом карциному ректума човека**“.

У Београду, 17.07.2020. године.

КОМИСИЈА:

др Милена Крајновић, научни сарадник, Институт за нуклеарне науке “Винча” – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

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

др Славица Кнежевић-Ушај, редовни професор у пензији, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду