

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

ПР...	20.11.2020	Према	Знајност
Орг. јед.			
05	11 050		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-708/27, од 08.10.2020. године именована је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом:

"Утицај полиморфизма гена за DNA метилтрансферазе на ток и исход меланома" кандидата *Хелене Марић* у следећем саставу:

1. Проф. др Берислав Векић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хирургија*, председник;
2. Проф. др Бобан Ђорђевић, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране, за ужу научну област *Пластична и реконструктивна хирургија*, члан;
3. Научни сарадник Данијела Максимовић, ИБИС Универзитета у Београду за ужу научну област *Онкологија и генетика*, члан;

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Хелене Марић и подноси Наставно-научном већу следећи:

ИЗВЕШТАЈ

2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Докторска дисертација кандидата Хелене Марић под називом "Утицај полиморфизма гена за DNA метилтрансферазе на ток и исход меланома", урађена под менторством проф. др Ружице Козомаре, редовног професора Медицинског факултета Војно-медицинске академије Универзитета одбране, за ужу научну област Оториноларингологија и максилофацијална хирургија, представља оригиналну студију која се бави анализом учесталости полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193 и rs2424932), код пацијената са меланомом и анализом разлике у учесталости генотипова испитиваних полиморфизама и повезаност са клиничким параметрима болести, стадијумом, нодалним статусом, Breslow индексом, бројем митоза, присуством тумор инфилтришућих лимфоцита.

Меланом има изузетно велики социјално-здравствени значај са порастом инциденце у свету и код нас. Петогодишње преживљавање код пацијената код којих се болест открије у првој фази је 90%, док свега 15-20% преживи пет година уколико се при дијагнози открију и удаљене метастазе. Увођењем биолошке терапије наступа значајно побољшање у лечењу и продужавања преживљавања болесника са меланомом. Ову терапију су омогућила сазнања из молекуларне генетике меланома, те је отуда огроман интерес за новим сазнањима из генетике и епигенетике меланома која би омогућила боље разумевање молекуларне основе меланома и указала на потенцијално нове облике терапије и нове биомаркере болести. Епигенетске промене су наследне промене генске експресије које за разлику од мутација немају промене у примарној нуклеотидној секвенци. Осим што су митотски наследне ове промене су и потенцијално реверзибилне, што пружа наду за увођење епигенетске терапије. Основни механизми епигенетске регулације су метилација DNA, модификације хистона и утицај регулаторних некодирајућих RNA (Ribonucleic acid) на генску експресију.

2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оргиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Претрагом литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података "Medline", "PubMed", и "KoBSON" помоћу следећих кључних речи: ("*gene polymorphisms*", "*DNA methyltransferase*", "*melanoma*") нису пронађене студије оваквог дизајна и методолошког приступа, чиме ова студија добија на значају и оригиналности. На основу тога, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Хелене Марић под називом "**Утицај полиморфизма гена за DNA метилтрансферазе на ток и исход меланома**", представља резултат оргиналног научног рада.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

Кандидат Хелена Марић је рођена 1984. године у Фочи. Завршила је основну школу и Гимназију са одличним успехом у Фочи. Дипломирала је на Медицинском факултету Универзитета Источно Сарајево 2010. године са просечном оценом 10.00, чиме је стекла стручно звање доктор медицине. Као најбољи је студент Медицинског факултета у Фочи добитница је бројних награда и признања. Специјалистички испит из Пластичне и реконструктивне хирургије положила је 2018. са одличним успехом и стекла звање специјалисте.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Клиничка и експериментална хирургија, уписала је школске 2011/2012. године. У току студија положила је све испите предвиђене планом и програмом. Запослена у Универзитетској болници у Фочи, а ради и као виши асистент на Медицинском факултету у Фочи.

Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

Научни радови објављени у целини у часописима:

1. **Maric H**, Supic G, Kandolf-Sekulovic L, Maric V, Mijuskovic Z, Radevic T, Rajovic M, Magic Z. DNMT1 and DNMT3B genetic polymorphisms affect the clinical course and outcome of melanoma patients. *Melanoma Res.* 2019;29(6):596-602. **M22**
2. **Marić H**, Cvijanović R, Ivanov I, Gvozdenović L, Ivanov D, Lalović N. Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumor of the Small Bowel Mesentery - Report of a Case. *Srp Arh Celok Lek.* 2015;143(9-10):619-22. **M23**
3. Ivanovic R, **Maric H**, Cancar V, Nikolic D, Lecic R, Arsenovic M. Possibility of operative treatment of uterine sarcoma: case report. *Ser J Exp Clin Res* 2019;20(3):277-279. **M51**

2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Спроведено истраживање у потпуности је усклађено са пријављеном темом докторске дисертације. Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Постављени циљеви истраживања остали су у највећој мери идентични са одобреним у пријави тезе. Примењена методологија истраживања идентична је са одобреном. Докторска дисертација Хелене Марић написана је на 136 страна и садржи следећа поглавља: Увод, Циљ рада, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Референце.

У уводном делу кандидат је јасно и прецизно изложио досадашња сазнања о меланому. Посебна пажња посвећена је досадашњим сазнањима о дијагнози меланом, терапији меланом, полиморфизма нуклеотидних секвенци и епигенетским регулацијама.

Јасно је изложен главни циљ, а то је одређивање учесталост полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193, rs2424932) код пацијената са примарним меланомом коже у различитим стадијумима болести и утврђивање разлике у учесталости генотипова испитиваних полиморфизама и повезаност са: клиничким параметрима болести, стадијумом, Breslow индексом, бројем митоза, присуством тумор инфилтришућих лимфоцита (eng. Tumor infiltrating leukocytes - TIL), факторима ризика, годинама, изложености сунцу, фототипом коже, током и исходом болести, односно са укупним преживљавањем (Kaplan - Meier).

Материјал и методологија рада су истоветни са наведеним у пријави дисертације. Методологија рада је приказана прецизно и на одговарајући начин. Детаљно су описане све технике коришћене у студији.

У наставку докторске дисертације, резултати истраживања систематично су приказани и адекватно и квалитетно документовани табелама, сликама и графиконима. Носиоци варијације генотипова DNMT1 rs2228612 су имали лошије изгледе за укупно преживљавање, као и преживљавање без рекуренције ($p=0.000$ и $p=0.000$). DNMT1 rs2228612 је повезан са улцерацијом ($p=0.045$), нодалним статусом ($p=0.030$),

прогресијом ($p=0.007$) и стадијумом болести ($p=0.003$). Униваријантне анализе указују да лимфоцити који инфилтришу туморе (TIL) могу бити маркери добре прогнозе код пацијената са меланомом ($HR=0.323$, $[0.127-0.855]$ 95% CI, $p=0.025$), док је генотипска дистрибуција DNMT3B rs406193 полиморфизама у значајној мери повезана са присуством TILs ($p=0.012$). Мултиваријантна анализа је показала да је DNMT1 (rs2228612) алел независтан прогностички фактор код пацијената са меланомом ($HR=12.126$ $[2.345-62.715]$ 95% CI), док је DNMT3B (rs2424932) изгубио своју значајност као прогностички фактор.

У поглављу Дискусија анализирани су добијени резултати и поређени са литературним подацима из ове области. Резултати су дискутовани у контексту сличних, различитих и конфликтних података из доступне литературе. При томе су наведени ставови из значајних оригиналних и ревијских научних радова поменуте области.

Литература је адекватна по обиму и садржају. Цитирано је 223 библиографских јединица из стручних публикација.

На основу предходно изнетих чињеница, комисија сматра да завршена докторска дисертација под називом **"Утицај полиморфизма гена за DNA метилтрансферазе на ток и исход меланома"**, по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној и одобреној теми дисертације.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања садржани су у следећим закључцима:

- У ову студију је укључено укупно 123 пацијента обољелих од меланома њих 70 било је мушког пола, док је преосталих 53 пацијената било женског пола
- Код највећег броја пацијената (50) меланом је био локализован на трупцу, затим на доњим екстремитетима 33, код 21 пацијента болест је била локализована у пределу главе и врата, код 14 на доњим екстремитетима, и најмање, код 5, на акралном делу тела
- Код мушкараца је скоро двоструко већа заступљеност тумора на трупцу и глави и врату него код жена. Код жена је била већа учесталост тумора локализованих на екстремитетима, и то доњим екстремитетима скоро троструко више него код мушкараца, и горњим екстремитетима 2.5 пута више код жена него код мушкараца
- Од укупно 123 обољела пацијента највећи број 38 је било у IV стадијуму. Стадијум II (A,B,C) је имало 44 пацијента, док је у трећем стадијуму (A,B,C) било њих 40
- Утврђена је је слична дистрибуција пацијената са Бреслов дебљином (< 4 и ≥ 4), као и са или без мутација или митозе у испитиваној групи пацијената. Мерењем степена инфилтрације тумора са лимфоцитима код највећег броја пацијената (58) нађена је non-brisk инфилтрација.
- У испитиваној групи пацијената највећи број пацијената се налазио у првом и другом стадијуму болести (83), а мањи број (40) у трећем стадијуму болести.
- Дистрибуција величине тумора у испитиваној групи пацијената је била слична, 57 пацијената има величину T1/2, док 66 има величину тумора T3/4.
- Код већег броја пацијената је утврђен негативан нодални статус (83), док је њих 40 имало позитивни нодални статус. Још већа разлика је утврђена кад је на основу патолошког налаза испитивана прогресија болести. Већина пацијената у

испитиваној групи (102) није имала прогресију, док је код свега 21 пацијента меланом био прогресиван.

- Испитивањем учесталости појаве генотипова у DNMT1 гену (*rs2228612*, *rs2228611* и *rs2114724*) и DNMT3B гену (*rs406193* и *rs2424932*) утврђена је статистички значајно већа учесталост хетерозигота *rs2228611* DNMT1 код мушкараца у односу на женски пол ($p=0,042$). Мушки пол је такође статистички значајно имао већу заступљеност мут генотипа *rs2114724* у DNMT1 гену ($p=0,003$) у односу на женски пол.
- У групи испитаника подељених према полу, бреслов дебљини, постојању митоза и TIL-у није уочена статистички значајна разлика у односу на дистрибуцију генотипова и алела *rs2228612* DNMT1 гена. Међутим, пацијенти са улцерацијама су у значајно већем броју имали wt генотип.
- Утврђена је статистички значајна удруженост полиморфизма *rs2228612* DNMT1 гена са стадијумом болести ($p=0,003$), нодалним статусом ($p=0,003$) и прогресијом тумора ($p=0,007$). Ови резултати су такође показали да је wt генотип значајно учесталији код пацијената са I/II стадијумом болести и код пацијената са негативним нодалним статусом у односу на пацијенте који су у III стадијуму болести и имају позитиван нодални статус. Пацијенти са прогресивним тумором значајно чешће су хетерозиготи, а ређе се налази wt генотип.
- Између група пацијената оболелих од меланома подељених у односу на клиничко-патолошке карактеристике као што су бреслов дебљина, улцерације, митоза, TIL, стадијум болести, величина тумора, нодални статус и прогресија тумора, није уочена статистички значајна разлика у односу на учесталост врсте детектованог генотипа DNMT1 (*rs2228611*).
- Статистичком обрадом резултата нису нађене статистички значајне разлике између полиморфизма *rs2114724* DNMT1 гена и клиничко патолошких карактеристика као што су стадијум болести, величина тумора, нодални статус, прогресија тумора, бреслов дебљина, улцерације, митоза и TIL.
- Обрада резултата је показала да између учесталости полиморфизма *rs406193* (C501T) DNMT 3B гена и пола, као и клиничко патолошких карактеристика као што су стадијум болести, величина тумора, нодални статус, прогресија тумора, бреслов дебљина, присуство улцерација, митоза није уочена значајна разлика. Међутим, значајно је већи број пацијената са wt генотипом који имају non-brisk TIL у односу на оне где TIL не постоји или је присутан brisk.
- Статистичка анализа је показала да између учесталости полиморфизма *rs2424932* DNMT гена и пола, као и клиничко патолошких карактеристика као што су стадијум болести, величина тумора, нодални статус, прогресија тумора бреслов дебљина, присуство улцерација, митоза и TIL није уочена статистички значајна разлика. Међутим, уочен је изразити тренд повезаности wt и одсуства прогресије меланома.
- Анализом кривих преживљавања, уочава се да при поређењу групе пацијената са мутираним генотипом у односу на оне са wt генотипом, особе које имају мутирани генотип (полиморфизмом у гену за *rs2228612* DNMT1) имају статистички значајно лошије укупно преживљавање.
- Анализом кривих преживљавања, утврђено је да су особе са мутираним генотипом DNMT1 (*rs2228612*) имале високо статистички значајно ($p=0,000022$) краћи период без напредовања болести у односу на особе са wt генотипом.
- Униваријантном анализом прогностичких фактора у односу на укупно преживљавање пацијената са меланомом, утврђено је да су прогресија болести, DNMT1 (*rs2228612*), и DNMT3B (*rs2424932*) статистички значајно удружени са високим ризиком за погоршање укупног преживљавања код пацијената са

меланомом. За разлику од ових фактора, присуство TIL-а представља добар прогностички маркер код пацијената са меланомом.

- Мултиваријантна анализа је показала да је DNMT1 (rs2228612) алел независан прогностички фактор код пацијената са меланомом, док је DNMT3B (rs2424932) изгубио своју значајност као прогностички фактор. Мултиваријантна анализа је, такође, показала да прогресија болести представља независан прогностички фактор код пацијената са меланомом.

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Резултати овог истраживања су показали по први пут да полиморфизам rs2228612 DNMT1 гена може бити удружен са смањеним укупним преживљавањем пацијената са меланомом. Такође, полиморфизам rs2424932 DNMT3B гена је показао снажан тренд удружености са прогресијом болести и ризиком за краће укупно преживљавање пацијената са меланомом. Полиморфизам rs406193 DNMT 3B гена је удружен са повећаним присуством тумор инфилтришућих лимфоцита (TIL) које су добар прогностички маркер. Ови налази указују да даља истраживања у овом правцу могу потенцијално довести до открића нових молекуларних маркера и/или нових терапија.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати овог истраживања су објављени у међународном часопису категорије M22

- **Maric H**, Supic G, Kandolf-Sekulovic L, Maric V, Mijuskovic Z, Radevic T, Rajovic M, Magic Z. DNMT1 and DNMT3B genetic polymorphisms affect the clinical course and outcome of melanoma patients. *Melanoma Res.* 2019;29(6):596-602. **M22**

ЗАКЉУЧАК

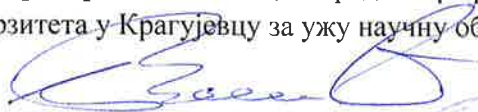
Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Хелене Марић под називом "**Утицај полиморфизма гена за DNA метилтрансферазе на ток и исход меланома**", на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру дисертације засновано на савременим научним сазнањима и да је адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Хелене Марић, урађена под менторством проф. др Ружице Козомаре, представља оригинални научни рад и има научни значај у анализи учесталости полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193 и rs2424932) код оболелих од меланома, као и расветљавању повезаности са клиничким параметрима болести, стадијумом, нодалним статусом, Breslow индексом, бројем митоза, присуством тумор инфилтришућих лимфоцита (TIL).

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, да докторска дисертација под називом "**Утицај полиморфизма гена за DNA метилтрансферазе на ток и исход меланома**" кандидата Хелене Марић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Проф. др Берислав Векић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хирургија*, председник



2. Проф. др Бобан Ђорђевић, ванредни професор Медицинског факултета Војно-медицинске академије Универзитета одбране, за ужу научну област *Пластична и реконструктивна хирургија*, члан



РЕДОВНИ

3. Научни сарадник Данијела Максимовић, ИБИС Универзитета у Београду за ужу научну област *Онкологија и генетика*, члан



САВЕТНИК

У Крагујевцу, 20.10.2020. године