

Биолошки факултет
Број захтева: 15/455-1
Датум: 15.07.2014.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду («Гласник Универзитета», број 131/06), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата: **Нине М. Петровић, дипломираног молекуларног биолога и физиолога.**

КАНДИДАТ: **Нина М. Петровић**

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„MicroRNA-21 (miR-21) као индикатор инвазивности карцинома дојке и потенцијални фактор за стратификацију пацијената са различитим статусом естрогенског (ER) и прогестеронског рецептора (PR)“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 27.03.2014. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-1354/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата која је гласила:

„Микро РНК-21 као индикатор инвазивности карцинома дојке код пацијената са различитим статусом естрогенског и прогестеронског рецептора“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: **Нине М. Петровић**, образована је на VIII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 13.06.2014. год, одлуком Факултета под бр. 15/373-13.06.2014. год. у саставу:

Име и презиме члана Комисије

Звање

Научна област

1) Др Весна Мандушић

Научни сарадник,
Универзитет у Београду-
Институт за нуклеарне науке
„Винча“

Молекуларна биологија

2) Др Горан Брајушковић

Ванредни професор,
Универзитет у Београду-
Биолошки факултет

Биохемија и
молекуларна биологија

3) Др Душанка Савић Павићевић

Ванредни професор,
Универзитет у Београду-
Биолошки факултет

Биохемија и
молекуларна биологија

Наставно-научно веће Биолошког факултета Универзитета у Београду прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: Нине М. Петровић, на IX редовној седници одржаној 15. јула 2014. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Прилог:

- 1. Извештај Комисије са предлогом.**
- 2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању извештаја**



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

15/455-15.07.2014.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на IX редовној седници одржаној 15.07.2014. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Нине М. Петровић, под називом:

„Микро РНК-21 као индикатор инвазивности карцинома дојке код пацијената са различитим статусом естрогенског и прогестеронског рецептора“

Универзитет је дана 27.03.2014. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-1354/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. **Petrović N, Mandušić V, Stanojević B, Lukić S, Todorović L, Roganović J, M23**
Dimitrijević B. The difference in miR-21 expression levels between invasive and non-invasive breast cancers emphasizes its role in breast cancer invasion. Medical Oncology 2014; 31(3):867-876.

2. **Petrović N, Mandušić V, Dimitrijević B, Roganović J, Lukić S, Todorović L, M23**
Stanojević B. Higher miR-21 expression in invasive breast carcinomas is associated with positive estrogen and progesterone receptor status in patients from Serbia. Medical Oncology 2014; 31(6):977-986.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13. јуна 2014. године, прихваћен је извештај ментора др Весне Мандушић и др Горана Брајушковића о урађеној докторској дисертацији Нине М. Петровић, истраживача сарадника Института за Нуклеарне Науке „Винча“ под насловом **“Микро РНК-21 као индикатор инвазивности карцинома дојке код пацијената са различитим статусом естрогенског и прогестеронског рецептора”**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. **Др Весна Мандушић**, научни сарадник Института за Нуклеарне Науке „Винча“
2. **Др Горан Брајушковић**, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду
3. **Др Душанка Савић-Павићевић**, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Нине Петровић**, под насловом **“Микро РНК-21 као индикатор инвазивности карцинома дојке код пацијената са различитим статусом естрогенског и прогестеронског рецептора”**, је урађена у Лабораторији за радиобиологију и молекуларну генетику Института за Нуклеарне Науке „Винча“, уз финансијску подршку Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије током пројекта ОН173049, Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Докторска дисертација је написана на 94 стране и садржи 24 слике, и 16 табела. Уводних страна (Насловна страна на српском и енглеском језику, Страна са информацијама о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику, Садржај) има 14. Дисертација се састоји из 7 поглавља: Увод (20 страна, 3 слике), Циљеви рада (3 стране), Материјал и методе (12 страна, 6 табела), Резултати (28 страна, 9 табела, и 21 слика), Дискусија (12 страна), Закључци (2 стране) и Литературе (149 референце на 17 страна). 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) 2 публикације из докторске дисертације (18 страна).

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 описани су карциноми дојке, фактори ризика, основни приступи у дијагностици и лечењу, подела карцинома дојке и познати молекуларни механизми укључени у настанак и прогресију карцинома дојке. Посебно су приказани стандардни дијагностички и прогностички параметри карцинома дојке, у које се убрајају животна доб пацијенткиња у тренутку постављања дијагнозе, величина тумора, хистолошки градус тумора, присуство локалних метастаза (статус регионалних лимфних чворова), као и статус, односно, ниво протеинске експресије естрогенског рецептора (ER), прогестеронског рецептора (PR), рецептора за епидермални фактор раста 2 (Her-2) и једарног протеина Ki-67. Преко нивоа експресије протеина Ki-67 дефинише се пролиферативни индекс тумора. У другом делу увода описана су досадашња сазнања о улози феномена РНК интерференције у експресији гена као и о улози поремећаја у процесима утишавања експресије гена молекулима микро РНК у патогенези малигних болести. Посебна пажња је посвећена улози онкогене микро РНК-21 у процесима одговорним за настанак и прогресију карцинома дојке. Такође, описано је и неколико најзначајнијих циљних гена ове микро РНК у епителијалним ћелијама дојке. Прекомерна експресија микро РНК-21 доводи до утишавања циљних гена, што за последицу може имати како неопластичну трансформацију ћелија дојке, тако и активирање процеса одговорних за прогресију, инвазију и метастазирање карцинома дојке. У трећем делу увода описана је *in silico* анализа микро РНК и алгоритми и софтверски алати који се користе за предикцију циљних гена микро РНК који функционишу на основу различитих карактеристика микро РНК и циљних иРНК, као што су: секундарна структура молекула РНК, термодинамичке карактеристике и РНК и циљних иРНК секвенци, међусобна комплементарност и конзервираност циљних места микро РНК кроз биолошке врсте.

У поглављу **ЦИЉЕВИ** јасно, концизно и на компетентан начин изнети су циљеви истраживања. Као основни циљ наведено је испитивање улоге микро РНК-21 у у процесу неопластичне трансформације ћелија дојке и то испитивањем разлике у нивоима експресије микро РНК-21 у узорцима неизмењеног ткива дојке и узорцима неинвазивних (*in situ*), инвазивних са неинвазивном компонентом (инвазивни асоциран са неинвазивним карциномом дојке) и инвазивним карциномима дојке. Циљеви рада обухватају и детаљну анализу нивоа експресије молекула микро РНК-21 у различитим подтипovima инвазивних карцинома дојке. Као следећи циљ назначено утврђивање могуће повезаности нивоа експресије микро РНК-21 са стандардним дијагностичким и прогностичким параметрима карцинома дојке. Последњи циљ био је *in silico* предикцијом циљних гена микро РНК-21 у туморском ткиву дојке.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** су приказане методе које су примењиване приликом анализе експресије молекула микро РНК-21 и нивоа експресије протеина ER, PR, Her-2 и Ki-67. Анализа експресије протеина ER, PR, Her-2 и Ki-67 рађена је имунохистохемијском методом ПАП коришћењем комерцијалних моноклонских антитела (RM-9101-S1 *Thermo Fisher Scientific*, M3569, *Dako*, A0485, *Dako* и RM9106-S1 *Thermo Fisher Scientific*, респективно) на парафинским ткивним пресецима. За изолацију микро РНК коришћена је метода класичне изолације укупне ћелијске РНК из неизмењеног и малигног ткива дојке *TRI Reagent-ом* по протоколу произвођача из свежег и уз помоћ *Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit-а* из узорака укалупљених у парафин. Концентрације изолованих узорака РНК проверавани су на *BioSpec-nano* апарату

(Shimadzu corporation, Japan), а квалитет узорака је провераван методом агарозне гел елсктрофорезе. За синтезу cDNK примењена је метода реверзне транскрипције *Steem-loop* RT-PCR-ом са *TaqMan®MicroRNA Reverse Transcription Kit*-ом и специфичним есејима за микро РНК-21 и малу једарну РНК-RNU6B. Умножавање cDNK реверзно преписане са микро РНК-21 рађено је квантитативним RT-qPCR-ом у реалном времену, Квантитативна анализа експресије микро РНК-21 молекула рађена је методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. *In silico* анализа предикције циљних молекула микро РНК-21 рађена је следећим алгоритмима и софтверским алатима: TargetScan Human 6.2, microRNA.org PicTar, miRDB и TarBase (DIANA TOOL). Резултати су обрађивани непараметријским статистичким тестовима-*Mann-Whitney U* тест-ом, *Kruskal-Wallis* тестом анализе варијансе опсега, а корелационе анализе-*Spearman*-овим тестовима корелације рангова. За обраду резултата коришћени су *Sigma Stat 3.5* (*Dundas Software, Ltd, Germany*) и *GraphPad Prism 5* (*GraphPad Software, Inc. CA*) софтверски програми.

У оквиру поглавља **РЕЗУЛТАТИ** јасно и прегледно су изнети експериментални резултати и резултати *in silico* анализе, који су руководећи се постављеним циљевима, подељени у седам целина. Резултати су представљени и графички, коришћењем табела и илустроване сликама на којима су приказани резултати имунохистохемијске анализе. Прва целина односи се на резултате селекције пацијенткиња на основу стандардних дијагностичких и прогностичких параметара карактеристичних за карцином дојке. Друга целина обухвата резултате имунохистохемијске анализе нивоа експресије протеина ER, PR, Her-2 и Ki-67 и приказани су репрезентативним микроскопским фотографијама. У трећој целини приказани су резултати детекције нивоа експресије микро РНК-21 у неизмењеном и туморском ткиву дојке као и разлике у нивоима експресије молекула микро РНК-21 између карцинома *in situ*, инвазивних са неинвазивном компонентом и инвазивних карцинома дојке. Детектоване разлике у нивоу експресије молекула микро РНК-21 у неизмењеном и туморском ткиву, показују да транскрипционо утишавање поседовнао молекулом микро РНК-21 вероватно има улогу у процесима који резултирају развоју инвазивности тумора, али не и у иницијацији процеса неопластичне трансформације епителијалних ћелија дојке. Детектоване разлике у нивоу експресије молекула микро РНК-21 у групи инвазивних карцинома и оних са неинвазивном компонентом, наводи да би ове подтипове карцинома дојке требало посматрати као засебне ентитете и да је порекло инвазивних карцинома вероватно индивидуалан процес и да могу настати од *in situ* карцинома, или *de novo*. У четвртном делу приказани су резултати испитивања постојања могуће асоцијације нивоа експресије микро РНК-21 са стандардним дијагностичким и прогностичких параметарима карцинома дојке (величина тумора, животна доби пацијенткиња у тренутку постављања дијагнозе, хистолошки и нуклеусни градус тумора, статус регионалних лимфних чворова, као и статус ER, PR, Her-2 рецептора и вредности пролиферативног индекса Ki-67). Утврђена је статистички значајне разлике у нивоима експресије молекула микро РНК-21 између група тумора подењених на основу статуса ER и PR. Показана је позитивна корелација између нивоа експресије молекула микро РНК-21 и нивоа експресије ER и PR у групи чистих инвазивних карцинома дојке. Затим су приказани резултати анализа разлике у нивоима експресије молекула микро РНК-21 у чистим инвазивним и неинвазивним карциномима дојке. Затим су приказани резултати анализа експресије микро РНК-21 са неинвазивном компонентом и то по групама туморских узорака формираних на основу стандардних дијагностичких и прогностичких параметара. Такође у овој целини анализирана је и повезаност процентуалне заступљености *in situ* компоненте са експресијом молекула микро РНК-21. У последњем делу поглавља приказани су резултати *in silico* анализе којом

су детектовани потенцијални таргетни молекули чија се експресија утишава активношћу молекула микро РНК-21 у малигном ткиву дојке.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** анализирани су добијени резултати који пре свега сугеришу о улози молекула микро РНК-21 у развоју инвазивног фенотипа карцинома дојке. 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 досадашњих студија. Поглавље **ДИСКУСИЈА** доприноси разумевању тумачења резултата личних истраживања допуњених резултатима објављеним у савременој научној литератури.

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

1. Ниво експресије молекула микро РНК-21 представља потенцијани биолошки маркер инвазивности карцинома дојке
2. У анализираној групи тумора, инвазивни лобуларни и инвазивни дуктални карциноми дојке се не разликују према детектованим нивоима експресије молекула микро РНК-21, што указује на то да би ниво експресије молекула микро РНК-21 могао представљати униварзални фактор инвазивности карцинома дојке.
3. Одсуство статистички значајне разлике у нивоима експресије молекула микро РНК-21 у узорцима неизмењеног ткива и неинвазивних карцинома дојке указује на то да поремећаји у регулацији експресије гена посредованих молекулом микро РНК-21 нису молекуларно-биолошки догађаји одговорни за иницијалну фазу неопластичне трансформације епителијелних ћелија дојке.
4. Разлике у нивоима експресије молекула микро РНК-21 у узорцима неинвазивних и инвазивних карцинома дојке са неинвазивном компонентом указују на могућу биолошку улогу молекула микро РНК-21 у процесима у којим *in situ* карциноми стичу особине инвазивних карцинома.
5. У групи анализираних инвазивних карцинома дојке асоцираних са неинвазивним ниво експресије молекула микро РНК-21 је у негативној корелацији са нивоом експресије протеина PR, чиме се потврђује њихова различитост од инвазивних карцинома дојке.
6. Резултат да у анализираној групи чистих инвазивних карцинома дојке постоји висок степен позитивне корелације између нивоа експресије молекула микро РНК-21 са нивоом експресије протеина ER i PR, указује на то да ниво експресије молекула микро РНК-21 може представљати нестандардни прогностички параметар карцинома дојке који би се користио у одабиру адекватне терапије за сваку пацијенткињу са карциномом дојке понаособ.
7. Молекул микро РНК-21 је потенцијални биолошки маркер који може представљати нестандардни дијагностички параметар карцинома дојке.

На крају ове докторске дисертације налази се поглавље **ЛИТЕРАТУРА** у коме је дата листа библиографских јединица. Она садржи 149 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. **Petrović N**, Mandušić V, Stanojević B, Lukić S, Todorović L, Roganović J, Dimitrijević B. The difference in miR-21 expression levels between invasive and non-invasive breast cancers emphasizes its role in breast cancer invasion. *Medical Oncology* 2014; 31(3):867-876. **M23**
2. **Petrović N**, Mandušić V, Dimitrijević B, Roganović J, Lukić S, Todorović L, Stanojević B. Higher miR-21 expression in invasive breast carcinomas is associated with positive estrogen and progesterone receptor status in patients from Serbia. *Medical Oncology* 2014; 31(6):977-986. **M23**

Радови и конгресна саопштења из уже научне области:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Roganović J, Radenković M, Tanić N, Tanić N, **Petrović N**, Stojić D. Impairment of acetylcholine-mediated endothelium-dependent relaxation in isolated parotid artery of the alloxan-induced diabetic rabbit. *European Journal of Oral Sciences* 2011; 119(5): 352–360. **M21**
2. Roganović J, **Petrović N**, Đukić LJ. Effect of neuropeptide Y on the norepinephrine-induced constriction in the rabbit facial artery after carotid artery occlusion. *Military and Medical Journal of Serbia* 2013; ID 3524. **M23**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Roganović J, **Petrović N**, Dedović-Tanić N, Tanić N, Stojić D. Diabetes-induced Expression of iNOS in Rabbit Parotid Artery. 45th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research (CED-IADR) with the Scandinavian Division, Budapest-Hungary, August 31-September 3, 2011. **M34**

Мишљење и предлог Комисије:

На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Нине Петровић под насловом **“Микро РНК-21 као индикатор инвазивности карцинома дојке код пацијената са различитим статусом естрогенског и прогестеронског рецептора”**.

У Београду, 20.06. 2014.

КОМИСИЈА:

Др Весна Мандушић, научни сарадник,
Институт за Нуклеарне Науке „Винча“,
Универзитет у Београду

Др Горан Брајушковић, ванредни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Др Душанка Савић Павићевић, ванредни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду