

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На I редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 14.10.2016. године, прихваћен је Извештај ментора проф. др Биљане Божић Недељковић да је **Марија Ђорђевић Црногорац**, истраживач-сарадник запослена у Институту за онкологију и радиологију Србије, завршила израду докторске дисертације под насловом **„Значај разлика нивоа имуноглобулина специфичних за меланин и тирозиназу у антитуморској имуности болесника са меланомом“**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Биљана Божић Недељковић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, ментор, др Ивана Матић, научни сарадник Института за онкологију и радиологију Србије, ментор, и др Горан Брајушковић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, члан.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Марије Ђорђевић Црногорац под насловом **„Значај разлика нивоа имуноглобулина специфичних за меланин и тирозиназу у антитуморској имуности болесника са меланомом“** је написана на 131 страници и садржи 5 слика, 30 графика и 27 табела. Текст докторске дисертације чине следећа поглавља: Увод (36 страна), Циљеви истраживања (2 стране), Материјал и методе (8 страна), Резултати (35 страна), Дискусија (17 страна), Закључци (2 стране) и Литература (31 страна). Дисертација садржи и насловну страну на српском и енглеском језику, страну са информацијама о менторима и члановима комисије, изјаве захвалности, стране са подацима о докторској дисертацији на српском и енглеском језику (наслов, резиме и кључне речи), као и садржај.

Докторска дисертација је урађена у Лабораторији за модификаторе биолошког одговора Института за онкологију и радиологију Србије.

Анализа докторске дисертације:

У **Уводу** докторске дисертације представљене су опште карактеристике меланома, класификација, епидемиолошки подаци, фактори ризика за настанак меланома, као и молекуларни механизми патогенезе меланома. Описан је значај имунског одговора покренутог од стране цитоплазматских и мембранских антигена неопластично трансформисаних меланоцита за клинички ток и исход болесника са меланомом. С обзиром да су најзначајнији меланомски диференцијациони антигени протеини који учествују у биосинтези пигмента

меланина, описан је пут биосинтезе меланина и приказан је ензим тирозиназа као антиген. Како би се истакао значај везе између туморске имуности и аутоимуности код болесника са меланомом, представљени су литературни подаци о постојању антитела специфичних за исте, меланомске антигене, који су присутни како на неопластично трансформисаним, тако и на неизмењеним меланоцитима, у серуму болесника са клиничком дијагнозом витилига. Описани су и повезаност и разлике имунског одговора код болесника са меланомом и болесника са витилигом. Затим је дат детаљан преглед антитуморских ефекторских механизма. У последњем одељку Увода описана су структурна и функционална својства дипептидил пептидазе IV (DPPIV или CD26), која је један од маркера активације имунских ћелија. Затим је детаљно приказана значајна улога DPPIV у регулацији имунских функција, као и у процесу неопластичне трансформације.

У оквиру поглавља **Циљеви истраживања** јасно су изложени циљеви научног рада. На основу података из литературе представљених у Уводу дисертације постављена је радна хипотеза:

1. Одређивање концентрације имуноглобулина специфичних за меланомске антигене, меланин и тирозиназу, IgM, IgG и IgA класе код болесника са меланомом је од важности за расветљавање значаја хуморалног имунског одговора у патогенези меланома.

Разлике у нивоима ових антитела између болесника са меланомом без метастаза и болесника са меланомом и метастазама могу да укажу на њихов значај за клинички ток и исход овог имуногеног малигног обољења. Добијени подаци би могли да допринесу развоју бољих имунотерапијских приступа у лечењу меланома. Одређивање специфичних субпопулација леукоцита код болесника са меланомом, као и одређивање експресије рецептора за одређене класе антитела на ефекторским ћелијама додатно би допринело карактеризацији антитуморског имунског одговора болесника са меланомом.

2. Одређивање ензимске активности DPPIV у серуму и нивоа експресије CD26 на лимфоцитима болесника са меланомом могу да укажу на улогу овог протеина у патогенези и прогресији меланома. Промене ензимске активности DPPIV и експресије CD26 на лимфоцитима код болесника са меланомом могу да имају клинички значај као потенцијални дијагностички маркери.

За проверу постављене радне хипотезе постављени су следећи циљеви истраживања:

1. Одредити ниво IgG, IgA и IgM класе антитела специфичних за меланин и тирозиназу у серуму болесника са меланомом, са и без метастаза, као и у серуму болесника са витилигом и здравих особа.

2. Одредити проценат лимфоцита који на својој површини експримирају FcγRIIIA, односно CD16, проценат лимфоцита који на својој површини експримирају CD56, као и проценат лимфоцита који експримирају и CD16 и CD56, код наведених група испитаника.

3. Одредити проценат гранулоцита који експримирају FcαRI, односно CD89, код наведених група испитаника.

4. Испитати повезаност нивоа антитела специфичних за меланин и тирозиназу и CD16/CD89⁺ ћелија у групи болесника са меланомом.

5. Одредити ензимску активност дипептидил пептидазе IV у серуму, проценат CD26⁺ лимфоцита и експресију CD26 антигена на лимфоцитима код болесника са меланомом, болесника са витилигом и здравих особа.

У поглављу **Материјал и методе** описана је селекција болесника са меланомом и болесника са витилигом и дат је адекватан приказ метода које су

примењиване у истраживању. У истраживање је било укључено 90 болесника са патохистолошки потврђеном дијагнозом меланом, који у тренутку узимања биолошких узорак нису примали никакву врсту онколошке терапије, и 40 болесника са клиничком дијагнозом витилига. Контролну групу чинило је 74 индивидуа без клиничких знакова меланом и витилига.

ELISA (енгл. *enzyme linked immunosorbent assay*) тестом одређиване су концентрације IgM, IgG и IgA антитела специфичних за меланин и тирозиназу у серуму испитаника. Одређивање процента CD16⁺, CD56⁺ и CD16⁺CD56⁺ лимфоцита, као и CD89⁺ гранулоцита вршено је из пуне крви анализом на FACSCalibur проточном цитометру применом одговарајућих флуоресцентно обележених моноклонских антитела. Одређивање нивоа протеинске експресије CD26 антигена на плазма мембранама лимфоцита вршено је такође методом проточне цитометрије. Поред средњег интензитета флуоресценције експресије CD26 на лимфоцитима, одређиван је и проценат CD26⁺ лимфоцита. Ензимска активност DPPIV у серуму мерена је директном фотометријском методом. За статистичку обраду података примењивани су Крускал-Валисов тест, Пирсонов χ^2 тест, Вилкоксонов тест суме рангова, Вилкоксонов тест суме рангова са корекцијом континуитета. За испитивање линеарне повезаности параметара од значаја коришћен је Спирманов тест корелације рангова, а за модел њихове везе коришћена је линеарна регресија. Методологија ROC криве (енгл. *Receiver-operating-characteristic Curve*) примењивана је за испитивање дијагностичког потенцијала испитиваних параметара.

У поглављу **Резултати** кандидаткиња је јасно и прегледно представила резултате истраживања у оквиру пет целина. Експериментални резултати представљени су графички и табеларно.

У првом делу приказани су резултати одређивања концентрације анти-меланинских и анти-тирозилазних антитела IgM, IgG и IgA класе у серуму болесника са меланомом, болесника са витилигом и здравих особа. Показано је да су болесници са меланомом без метастаза имали статистички значајно виши ниво анти-меланинских IgG антитела у односу на болеснике са витилигом и здраве особе, као и у односу на болеснике са меланомом који су имали метастазе. Болесници са витилигом и болесници са меланомом без и са метастазама имали су нижи ниво IgG антитела специфичних за тирозиназу у односу на здраве особе. Нивои анти-меланинских и анти-тирозилазних IgM антитела код болесника са меланомом били су статистички значајно нижи у односу на нивое ових антитела код здравих особа. Запажено је да је група болесника са меланомом имала виши ниво анти-меланинских и анти-тирозилазних IgA антитела у односу на болеснике са витилигом и здраве особе, док су болесници са витилигом имали виши ниво ових антитела у поређењу са здравим особама. У овом одељку представљени су и резултати ROC анализе која је урађена како би се проценила сензитивност и специфичност нивоа антитела специфичних за меланин и тирозиназу IgG, IgA и IgM класе између групе болесника са меланомом и групе здравих особа. Резултати ове анализе су показали да анти-меланинска IgG, IgA и IgM антитела, као и анти-тирозилазна IgA и IgM антитела имају статистички значајну моћ дискриминације болесника са меланомом у односу на здраве особе.

У другом делу поглавља приказани су резултати одређивања експресије CD16 и CD56 антигена на површини лимфоцита и експресије CD89 антигена на површини гранулоцита. Група болесника са меланомом имала је статистички значајно мањи проценат CD16⁺ лимфоцита у популацији укупних леукоцита, значајно мањи проценат CD56⁺ лимфоцита и CD16⁺CD56⁺ лимфоцита у популацији укупних леукоцита у односу на групу здравих особа. Болесници са

меланомом имали су и значајно виши проценат CD89⁺ гранулоцита у популацији укупних леукоцита у односу на здраве особе.

У трећем делу поглавља представљени су резултати одређивања ензимске активности DPPIV у серуму и експресије CD26 антигена на лимфоцитима. Показано је да су болесници са меланомом имали статистички значајно нижу активност DPPIV у серуму и значајно мањи проценат CD26⁺ лимфоцита у популацији укупних леукоцита у односу на групу здравих особа и групу болесника са витилигом. Смањење ензимске активности DPPIV, и процента CD26⁺ лимфоцита, код болесника са меланомом није било зависно од присуства метастатске болести. Ензимска активност DPPIV у серуму, и проценат CD26⁺ лимфоцита у популацији укупних леукоцита показали су статистички значајну моћ дискриминације болесника са меланомом у односу на здраве особе.

Учесталости лимфоцита и гранулоцита у групама испитаника приказане су у четвртом одељку. Група болесника са меланомом имала је статистички значајно мањи проценат лимфоцита и већи проценат гранулоцита у односу на групу болесника са витилигом, као и у односу на групу здравих особа.

У петом одељку су табеларно представљени резултати испитивања корелације између процента CD16⁺ и CD16⁺CD56⁺ лимфоцита и концентрације анти-меланинских и анти-тирозилазних IgG антитела, као и процента CD89⁺ гранулоцита и концентрације анти-меланинских и анти-тирозилазних IgA антитела, у групи болесника са меланомом. Није уочено постојање линеарне повезаности између испитиваних параметара.

У поглављу **Дискусија** представљено је тумачење добијених експерименталних резултата, као и њихова упоредна анализа са подацима из литературе. Посебно је истакнуто да резултати истраживања представљају нова сазнања у литератури о хуморалној имуности специфичној за меланомске антигене код болесника са меланомом. Подаци о имуности специфичној за тирозилазу су у складу са познатим сазнањима из литературе. Док присуство антитела специфичних за меланин код болесника са меланомом и болесника са витилигом представљају нове податке у савременој литератури. Детаљно су разматрани могући узроци измењених концентрација анти-меланинских и анти-тирозилазних антитела IgG, IgM и IgA класе код болесника са меланомом, као и њихов значај за антитуморски имунски одговор. Анализиран је и могући клинички значај снижене активности DPPIV у серуму и сниженог процента CD26⁺ лимфоцита у популацији укупних леукоцита који су запажени код болесника са меланомом. Добијени резултати потврђују везу DPPIV и имунског система и указују на улогу DPPIV у механизмима патогенезе меланома.

У поглављу **Закључци** кандидаткиња је јасно изнела најзначајније закључке изведене из резултата истраживања спроведених у оквиру докторске дисертације.

Поглавље **Литература** садржи 381 библиографску јединицу које су адекватно цитиране у тексту.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Đorđić M**, Matić IZ, Filipović-Lješковић I, Džodić R, Šašić M, Erić-Nikolić A, Vuletić A, Kolundžija B, Damjanović A, Grozdanić N, Nikolić S, Pralica J, Dobrosavljević D, Rašković S, Andrejević S, Juranić Z. Immunity to melanin and to tyrosinase in melanoma patients, and in people with vitiligo. *BMC Complement Altern Med* 2012;12:109. (M₂₁, IF 2.24)
2. Matić IZ, **Đorđić M**, Grozdanić N, Damjanović A, Kolundžija B, Erić-Nikolić A, Džodić R, Šašić M, Nikolić S, Dobrosavljević D, Rašković S, Andrejević S, Gavrilović D, Cordero OJ, Juranić ZD. Serum activity of DPPIV and its expression on lymphocytes in patients with melanoma and in people with vitiligo. *BMC Immunol* 2012;13:48. (M₂₂, IF 3.00)

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Đorđić M**, Matić IZ, Lješковић I, Džodić R, Šašić M, Erić-Nikolić A, Radovanović A, Juranić Z. Anti-melanin immunity in patients with melanoma. *Eur J Cancer, Supplement 1*, 2011; 47: S118. (M₃₄)
2. Matić IZ, **Đorđić M**, Erić-Nikolić A, Đorđević M, Šašić M, Džodić R, Juranić Z. Serum activity of DPPIV and its expression on lymphocytes in patients with melanoma. *Eur J Cancer, Supplement 1*, 2011; 47: S118. (M₃₄)

Мишљење и предлог Комисије:

Увидом у докторску дисертацију **Марије Ђорђевић Црногорац** под насловом: „**Значај разлика нивоа имуноглобулина специфичних за меланин и тирозиназу у антитуморској имуности болесника са меланомом**“, чији смо приказ дали у извештају, закључујемо да је докторска дисертација добро и јасно написана, да је у складу са образложењем наведеним у пријави теме и да садржи све релевантне елементе неопходне за овакву врсту рада. Приказани резултати јасно потврђују успешну реализацију постављених циљева истраживања. Докторска дисертација Марије Ђорђевић Црногорац представља оригинални научни допринос у области експерименталне онкологије. Резултати истраживања који су приказани у овој докторској дисертацији представљају нове податке у литератури о постојању измењених нивоа антитела специфичних за меланин и тирозиназу код болесника са меланомом. По први пут у савременој научној литератури су публиковани и подаци о значајно сниженој активности DPPIV у серуму и сниженом проценту CD26⁺ лимфоцита у популацији укупних леукоцита код болесника са меланомом.

Експериментални резултати ове докторске дисертације су публиковани у два научна рада, од којих је један рад објављен у врхунском међународном часопису (M₂₁), док је други рад објављен у истакнутом међународном часопису (M₂₂).

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и проследи га Већу области Универзитета у Београду на даље одлучивање.

У Београду, 10.11.2016. године

КОМИСИЈА:

др Биљана Божић Недељковић, ванредни професор,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Ивана Матић, научни сарадник,
Институт за онкологију и радиологију Србије

др Горан Брајушковић, ванредни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет