

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 Горана Брајушковића** о урађеној докторској дисертацији **Зоране З. Николић**, мастер биолога, под насловом **“Студија асоцијације варијанти у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса са ризиком за развој и прогресију карцинома простате код болесника из Србије”** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: **др Горан Брајушковић**, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, **др Душанка Савић Павићевић**, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, **др Милена Крајновић**, научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду и **др Никола Танић**, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Зоране З. Николић под називом **„Студија асоцијације варијанти у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса са ризиком за развој и прогресију карцинома простате код болесника из Србије“** урађена је у Центру за хуману молекуларну генетику Биолошког факултета Универзитета у Београду у оквиру пројекта **„Анализа промена у структури генома као дијагностички и прогностички параметар хуманих болести“** (ОИ 173016). Дисертација је написана на 182 стране и састоји се из 8 поглавља: Увод (23 стране), Циљеви (1 страна) Материјал и методе (29 страна), Резултати (51 страна), Дискусија (24 стране), Закључци (2 стране), Литература (25 страна) и Прилози (27 страна). Рад садржи 229 литературних цитата, 32 слика и 49 табела, Садржај и Сажетак на српском и енглеском језику.

У оквиру докторске дисертације Зорана Николић испитивала је асоцијацију варијанти у генима за микроРНК (rs2910164 у *hsa-miR-146a*, rs3746444 у *hsa-miR-499*, rs11614913 у *hsa-miR-196a2* и rs895819 у гену за *miR-27a*) и за протеине утишавајућег комплекса (rs3742330 у *DICER1*, rs4961280 у *AGO2*, rs784567 у *TARBP2*, rs7813 у *GEMIN4* и rs197414 у *GEMIN3*) са ризиком за развој и прогресију карцинома простате (КП).

Циљ ове студије био је да се утврди могућа асоцијација алела и генотипова анализираних генетичких варијанти са ризиком за развој КП. Затим, циљ је био да се испита њихова могућа асоцијација са вредностима стандардних прогностичких

параметара КП, као и са ризиком за прогресију КП у групи болесника из Србије. Један од циљева ове дисертације био је и да се испита ефекат потенцијалних статистичких епистатичких интеракција између варијанти у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса на ризик за развој и прогресију КП. Такође, међу циљеве студије убраја се и спровођење мета-анализе резултата ове и претходних студија које се односе на асоцијацију варијанти у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса са ризиком за развој КП и других малигних тумора.

АНАЛИЗА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

У **Уводу** кандидат Зорана Николић приказује основне податке о простати као ендокриној жлезди у саставу мушког полног система, као и о најчешћим болестима простате. Представљени су основни епидемиолошки подаци, фактори ризика за КП, дијагностика и лечење КП, као и стандардни прогностички параметри КП: серумска вредност простата-специфичног антигена (ПСА), збирни Глисон градус (ГС) и клинички стадијум примарног тумора одређен по ТНМ систему класификације КП. У оквиру одељка који се односи на молекуларну основу КП наведене су основне соматске мутације асоциране са КП, као и епигенетичке промене укључене у развој и/или прогресију ове болести. Такође, представљени су дизајн и резултати два основна типа студија генетичке асоцијације везане за КП, студија генетичких асоцијација на читавом геному (GWAS) и студија базираних на генима кандидатима. У овом поглављу докторске дисертације описан је процес РНК интерференција базиран на активностима молекула микроРНК, као и улога овог процеса у молекуларној основи КП. Наведени су генетичке варијанте у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса за које је у ранијим студијама испитивана асоцијација са ризиком за развој и/или прогресију КП.

У поглављу **Циљеви** наведено је осам главних научних циљева ове дисертације. Прва три циља односе се на испитивање потенцијалне асоцијације варијанти у генима за микроРНК са 1) ризиком за развој КП, 2) вредностима стандардних прогностичких параметара КП, као и са 3) ризиком за прогресију КП. Слично, дефинисани су циљеви који се односе на анализу асоцијације варијанти у генима за протеине утишавајућег комплекса са 4) ризиком за развој болести, 5) вредностима стандардних прогностичких параметара КП, као и са 6) ризиком за прогресију КП. Осим испитивања појединачних ефеката генетичких варијанти, један од циљева ове дисертације био је и 7) анализа ефеката потенцијалних статистичких епистатичких интеракција између варијанти у генима за микроРНК и протеине утишавајућег комплекса на ризик за развој и прогресију КП. Такође, циљ је био и 8) спровођење мета-анализе резултата ове докторске дисертације и претходних студија које су анализирале асоцијацију варијанти у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса са КП и другим малигним туморима.

У поглављу **Материјал и методе**, кандидат описује начин селекције 355 болесника са КП, 360 болесника са бенигном хиперплазијом простате (БХП) као и контролне групе коју је сачињавало 318 мушкараца без знакова болести простате. Наведени су критеријуми за селекцију болесника са КП у групе са различитим ризиком за прогресију болести а на основу вредности стандардних прогностичких параметара. Кандидат у оквиру овог

поглавља описује и методе коришћене за изолацију геномске ДНК из крви и бриса букалне слузнице, као и проверу количине и квалитета добијених изолата. Наведни су и критеријуми за одабир генетичких варијанти за анализу у оквиру ове дисертације, као и експерименталне методе за генотипизацију наведених варијанти, а које укључују: примену TaqMan® есеја за генотипизацију полиморфизама, метода анализе полиморфизама у дужини рестрикционих фрагмената базирана на ланчаној реакцији полимеразе (ПЦР-РФЛП), анализу крива топљења високе резолуције (ХРМА), примену ПЦР-а специфичног за алел, као и есеја за генотипизацију базираног на ПЦР-у у реалном времену уз употребу специфичних проба. Такође, описане су и статистичке методе за анализу резултата генотипизације у циљу утврђивања потенцијалних асоцијација са ризиком за развој КП, вредностима стандардних прогностичких параметара КП, ризика за прогресију болести, као и ефеката потенцијалних статистичких епистатичких интеракција између анализираних генетичких варијанти на ризик за развој и прогресију КП. На крају, кандидат детаљно описује процедуру селекције студија за мета-анализу, екстракције релевантних података, као и статистичку обраду резултата ове дисертације и претходних студија током процене њихове хетерогености и у оквиру квантитативне синтезе података.

У поглављу **Резултати** кандидат је јасно изложио експерименталне резултате ове дисертације. Најпре су приказани резултати селекције болесника са КП на основу вредности стандардних прогностичких параметара КП, као и на основу процењеног ризика за прогресију болести. Код највећег броја болесника установљене су високе серумске вредности ПСА (>20 ng/ml), ниске вредности ГС (<7), као и стадијум примарног тумора Т2. Резултати класификације болесника према два различита критеријума за процену ризика за прогресију болести, препорученим од стране D'Amico-а и сарадника, као и Medeiros-а и сарадника, показали су висок ризик за прогресију КП код већине болесника са КП. Провером количине и квалитета изоловане геномске ДНК електрофорезом установљена је успешна изолације геномске ДНК из крви болесника са КП и БХП, као и из брисева букалне слузнице здравих мушкараца из контролне групе.

На основу претходно задатих критеријума за анализу у оквиру ове дисертације изабране су четири генетичке варијанте у генима за микроРНК: rs2910164 у *hsa-miR-146a*, rs3746444 у *hsa-miR-499*, rs11614913 у *hsa-miR-196a2* и rs895819 у гену за miR-27a. Такође, изабрано је пет варијанти у генима за протеине утишавајућег комплекса: rs3742330 у *DICER1*, rs4961280 у *AGO2*, rs784567 у *TARBP2*, rs7813 у *GEMIN4* и rs197414 у *GEMIN3*. Наведене генетичке варијанте генотипизоване успешно су коришћењем адекватних метода за анализу и ни за једну није утврђено одступање расподела генотипова од претпоставки Хадри-Вајнбергове равнотеже.

За варијанте rs2910164, rs3746444 и rs11614913 лоциране у генима за микроРНК није установљена статистички значајна асоцијација са ризиком за развој КП. С друге стране, за мање учестали алел С варијанте rs895819 у гену за miR-27a показана је асоцијација са повећаним ризиком за развој КП, при чему је статистичка значајност достигнута у тестовима за два генетичка модела, доминантни и овердоминантни. Када је реч о анализираним варијантама у генима за протеине утишавајућег комплекса, резултати тестова њихове асоцијације са ризиком за развој КП нису били статистички значајни.

Ни за једну од анализираних варијанти у генима за микроРНК није утврђена асоцијација са серумским вредностима ПСА. За варијанту rs2910164 у гену *hsa-miR-146a* установљена је асоцијација са вредностима ГС. Такође, за ову генетичку варијанту, као и за rs895819 у гену за miR-27a показана је асоцијација са клиничким стадијумом примарног тумора, развојем удаљених метастаза и ризиком за прогресију болести одређеним према критеријумима Medeiros-а и сарадника. За варијанту rs3746444 у гену *hsa-miR-499* установљена је асоцијација са ризиком за прогресију КП одређеним према критеријумима D'Amico-а и сарадника.

Међу анализираним варијантама у генима за протеине утишавајућег комплекса само је за rs784567 у гену *TARBP2* показана асоцијација са серумским вредностима ПСА. Асоцијација са ГС установљена је за варијанте rs3742330 у гену *DICER1* и rs4961280 у гену *AGO2*. За обе наведене генетичке варијанте, као и за rs7813 у гену *GEMIN4*, показана је асоцијација са клиничким стадијумом примарног тумора. Такође, за хомозигот за мање учестали алел G генетичке варијанте rs3742330 у гену *DICER1* утврђена је асоцијација са смањеним ризиком за прогресију КП према рецесивном генетичком моделу. Ни за једну анализирану варијанту у генима за протеине утишавајућег комплекса није показана асоцијација са развојем удаљених метастаза код болесника са КП.

У анализи асоцијације статистичких епистатичких интеракција између варијанти у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса са ризиком за развој КП није добијена статистичка значајност. С друге стране, у тесту који се односио на асоцијацију са ризиком за прогресију болести, добијени су статистички значајни резултати за најбољи модел од три интерагујућа локуса: rs11614913 у гену *hsa-miR-196a2*, rs784567 у гену *TARBP2* и rs7813 у гену *GEMIN4*.

На крају, спроведена је мета-анализа резултата ове студије, као и претходно публикованих резултата који су се односили на асоцијацију варијанти у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса са ризиком за развој малигних тумора. Довољан број студија за спровођење мета-анализе асоцијације са ризиком за развој КП пронађен је само за генетичку варијанту rs2910164 у гену *hsa-miR-146a*. У наведеној мета-анализи која је укључивала резултате три студије случајева и контрола није добијена статистичка значајност за тестирану асоцијацију. С друге стране, за rs2910164 утврђена је асоцијација са ризиком за развој карцинома мокраћне бешике, грлића материце, јетре, плућа и желуца, као и сквамозног карцинома грла и назофарингеалног карцинома. Истовремено, није установљена значајна разлика у резултатима добијеним у популацијама европског и азијског порекла на основу резултата подгрупне мета-анализе базиране на етничком пореклу испитаника.

У **Дискусији** кандидат Зорана Николић тумачи резултате и пореди их са резултатима претходних публикација које се односе на асоцијацију варијанти у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса са ризиком за развој и/или прогресију КП. Дискутоване су сличности и разлике у наведеним резултатима, као и потенцијални узроци добијених разлика, укључујући етничко порекло испитаника. Поред тога, забележене асоцијације дискутоване су у контексту потенцијалног функционалног значаја анализираних генетичких варијанти, односно ефеката на биогенезу и функцију молекула

микроРНК, као и функције протеина утишавајућег комплекса. У оквиру овог поглавља кандидат објашњава оправданост спровођења студије случајева и контрола популацији Србије, као првој европској популацији у којој је анализиран допринос варијанти у генима укљученим у механизме РНК интерференције посредоване молекулима микроРНК ризику за развој и прогресију КП. Такође, дискутован је значај додатних репликационих и валидационих студија са истом темом истраживања дефинисању анализираних генетичких варијанти као кандидата за нестандартне прогностичке параметре који би се могли користити за дизајн унапређених алгоритама за процену ризика за развој и прогресију КП. Кандидат у оквиру овог поглавља објашњава и значај испитивања статистичких епистатичких интеракција у студијама генетичких асоцијација, као и ограничења приступа базираним на анализама ефеката појединачних генетичких варијанти. На крају, објашњен је значај квантитативне синтезе резултата већег броја студија које за тему имају асоцијацију истих генетичких варијанти са КП и другим малигним болестима. На основу резултата мета-анализе, кандидат дискутује потенцијалне узроке одступања у резултатима ове докторске дисертације и претходних студија, као и тумор-специфичне ефекте генетичке варијанте укључене у мета-анализу, значај разлика у етничком пореклу испитаника, као и разлика у величини студија и начину регрутовања болесника и контролне групе.

У поглављу **Закључци** таксативно су наведени резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације. Асоцијација са ризиком за развој КП установљена је само за варијанту rs895819 у гену за miR-27a. За исту генетичку варијанту, као и rs2910164 у гену *hsa-miR-146a* установљена је асоцијација са вредностима стандардних прогностичких параметара КП. Такође, за варијанту rs3746444 у гену *hsa-miR-499* установљена је асоцијација са ризиком за прогресију КП. Када је реч о варијантама у генима за протеине утишавајућег комплекса, за варијанте rs784567 у гену *TARBP2*, rs3742330 у гену *DICER1*, rs4961280 у гену *AGO2*, као и за rs7813 у гену *GEMIN4* показана је асоцијација са вредностима стандардних прогностичких параметара. Истовремено, за rs3742330 у гену *DICER1* утврђена је асоцијација са ризиком за прогресију КП.

У оквиру **Литературе** дата је листа од 229 библиографских јединица. Наведене публикације цитиране су на начин адекватан за објашњавање и поткрепљивање добијених резултата.

У поглављу **Прилози** приказани су резултати тестова присуства Харди-Вајнбергове равнотеже у контролној групи за све анализиране генетичке варијанте. Такође, у овом поглављу наведени су резултати тестова асоцијације испитиваних варијанти са вредностима стандардних прогностичких параметара и ризиком за прогресију КП у којима нису добијени статистички значајни резултати. Даље, наведене су карактеристике студија искључених из мета-анализе на основу одступања дистрибуција генотипова од Харди-Вајнбергове равнотеже у контролној групи, као и табела оцена методолошког квалитета студија укључених у мета-анализу. На крају, приказане су подгрупне мета-анализе базиране истовремено на два критеријума: типу малигног тумора и етничком пореклу испитаника.

БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Nikolić Z**, Savić Pavićević D, Vučić N, Cerović S, Vukotić V, Brajušković G. **M21**
Genetic variants in RNA-induced silencing complex genes and prostate cancer. World J Urol. 2016. DOI: 10.1007/s00345-016-1917-0 (IF₂₀₁₄=2.666)
2. **Nikolić Z**, Savić Pavićević D, Vučić N, Romac S, Brajušković G. Association **M21**
between genetic variant in hsa-miR-146a gene and cancer risk: an updated meta-analysis. Public Health Genomics 2015; 18(5):283-98. (IF₂₀₁₃=2.462)
3. **Nikolić Z**, Savić Pavićević D, Vučić N, Cidilko S, Filipović N, Cerović S, **M21**
Vukotić V, Romac S, Brajušković G. Assessment of association between genetic variants in microRNA genes hsa-miR-499, hsa-miR-196a2 and hsa-miR-27a and prostate cancer risk in Serbian population. Experimental and Molecular Pathology 2015; 99:145-50. (IF₂₀₁₃=2.881)
4. **Nikolić Z**, Savić Pavićević D, Vukotić V, Tomović S, Cerović S, Filipović N, **M21**
Romac S, Brajušković G. Association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and prostate cancer progression: evidence from Serbian population. Cancer Causes Control. 2014; 25(11):1571-5. (IF₂₀₁₂= 3.200)

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу

1. **Nikolić Z**, Savić Pavićević D, Vučić N, Cidilko S, Vukotić V, Filipović N, **M34**
Romac S, Brajušković G. Assessment of association between rs496128 located in AGO2 gene and prostate cancer risk in Serbian population. Book of abstracts: 38. 11th Balkan Congress of Human Genetics. Belgrade, Serbia. 17th-20th September 2015.
2. **Nikolić Z**, Savić Pavićević D, Vučić N, Cidilko S, Vukotić V, Filipović N, **M34**
Romac S, Brajušković G. Analysis of potential association between genetic variants in microRNA genes hsa-miR-499 and hsa-miR-196a2 and prostate cancer risk in Serbian population. European Journal of Human Genetics 2015; 23(Suppl 1): 471. European Human Genetics Conference 2015. Glasgow, Scotland, UK. June 6-9, 2015.
3. **Nikolić Z**, Savić Pavićević D, Vučić N, Vukotić V, Tomović S, Cerović S, **M34**
Filipović N, Romac S, Brajušković G. Assessment of association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and prostate cancer risk in Serbian population. European Urology Supplements 2014; 13(5):127. 6th European Multidisciplinary Meeting on Urological Cancers (EMUC) — 3rd Meeting of the EAU Section of Urological Imaging (ESUI). 13–16 November 2014. Lisbon, Portugal.

4. **Nikolić Z**, Savić Pavićević D, Vučić N, Vukotić N, Tomović S, Cerović S, Filipović N, Romac S, Brajušković G. Assessment of association between genetic variant rs7813 in GEMIN4 and prostate cancer risk in Serbian population. European Urology Supplements 2014; 13(7): e1505. EAU 10th South Eastern European Meeting (SEEM). 24-26 October 2014, Belgrade, Serbia. **M34**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја штампана у изводу

1. **Nikolić Z**, Savić Pavićević D, Vučić N, Filipović N, Vukotić V, Romac S, Brajušković G. Assessment of association between rs895819 in miR-27a and prostate cancer risk in Serbian population. Book of abstracts:46. V Congress of the Serbian Genetic Society. Kladovo (Belgrade). 28. Septembra – 2. Oktobra 2014. **M64**

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација Зоране З. Николић, под насловом: “**Студија асоцијације варијанти у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса са ризиком за развој и прогресију карцинома простате код болесника из Србије**”, представља оригинални рад из области молекуларне биологије (хумане молекуларне генетике). Ово је прва студија случајева и контрола спроведена у популацији европског порекла у оквиру које је анализирана асоцијација варијанти у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса са ризиком за развој и прогресију КП. Научну оправданост спроведене студије потврђују и резултати којима су утврђене нове генетичке асоцијације наведених генетичких варијанти, како са ризиком за развој КП, тако и са стандардним прогностичким параметрима и ризиком за прогресију ове болести. Стога, резултати ове докторске дисертације представљају допринос истраживањима која су усмерена ка идентификацији генетичких варијанти које би се користиле као нестандардни прогностички параметри у праћењу и лечењу болесника са КП. На основу свега наведеног, предлагемо Научно наставном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати ову докторску дисертацију и одобри јавну одбрану.

Чланови комисије:

Проф. др Горан Брајушковић,
Биолошки факултет Универзитета у Београду

Проф. др Душанка Савић Павићевић,
Биолошки факултет Универзитета у Београду

др Милена Крајновић,
Институт за нуклеарне науке „Винча“
Универзитета у Београду

др Никола Танић,
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Универзитета у Београду

У Београду, 25. октобар 2016. године