

## NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 03.11.2020 god., broj 9700/11, imenovana je komisija za ocenu završne doktorske disertacije pod naslovom:

### **“Dijagnostički i prognostički značaj nivoa duge nekodirajuće RNK GAS5 u plazmi pacijenata obolelih od nesitnoćelijskog karcinoma pluća”**

kandidata dr Nataše Vešović, zaposlene u Klinici za grudnu i kardio hirurgiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Mentor je Prof. dr Dragana Jovanović. Komentor je Doc. dr Darko Zdravković.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu :

1. Prof. dr Vesna Škodrić Trifunović
2. Doc. dr Milan Savić
3. Prof. dr Snežana Pajović, Medicinski fakultet Niš

Na osnovu priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završne doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći izveštaj.

## IZVEŠTAJ

### **A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija dr Nataše Vešović napisana je na 124 strane i sadrži sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, metod istraživanja, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 21 tabela i 44 slike. U njoj postoji sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografija kandidata, podaci o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

**Uvod** čini epidemiologija karcinoma pluća, faktori rizika i prevencija karcinoma pluća. Navedeni su tipovi tumora pluća prema najnovijoj klasifikaciji iz 2015. godine, a zatim i načini i mogućnosti dijagnostike ovih oboljenja u savremenoj medicini. Savremeni stejdžing nesitnoćelijskog karcinoma pluća je naveden (*8th IASLC TNM Classification* iz januara 2017. godine), a sveobuhvatno su opisani svi današnji modaliteti lečenja.

U uvodnom delu doktorata je takođe opisana genetska osnova karcinoma pluća kao i epigenetske promene i na kraju su date karakteristike i uloga duge nekodirajuće RNK kao i postojeće korelacije GAS5 sa karcinomom pluća.

**Ciljevi istraživanja** su jasno definisani. Prvi cilj je bio da se ispita razlika u nivou ekspresije GAS5 kod zdravih ispitanika i obolelih od ovog malignoma. Zatim, sledeći cilj je bio da se, takodje, ispita razlika u nivou ekspresije duge nekodirajuće RNK GAS5 u zavisnosti od podtipa i veličine tumora. Završni cilj je ispitivanje razlike nivoa GAS5 kod obolelih od neoplazme pluća zavisno od stadijuma bolesti.

**Metod istraživanja** je sproveden kao kliničko-laboratorijska studija preseka u kojoj su ispitanici podeljeni na kontrolnu i eksperimentalnu grupu. Kontrolnu grupu su činili zdravi i imunokompetentni dobrovoljci a eksperimentalnu novootkriveni pacijenti oboleli od nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Svi ispitanici su prethodno detaljno informisani i svojevolejno su potpisali učešće u studiji. Klinički deo istraživanja je sproveden u Klinici za onkologiju KBC "Bežanijska Kosa" a laboratorijski u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu. Ovo istraživanje je odobreno od strane nadležnog Etičkog komiteta KBC "Bežanijska Kosa" i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu. Uzorak za ispitivanje je činila venska krv u količini od desetak mililitara koja se po prikupljanju centrifugirala i pažljivo se na dalje odvajao supernatant plazme. Postupak izolacije ukupne RNK je izvršen upotrebom Trizol reagensa prema upustvima proizvođača. Komplementarna DNK se sintetizovala iz totalne RNK. Nakon toga, ekspresija duge nekodirajuće RNK GAS5 određivana je kvantitativnom Real Time PCR metodom. Amplifikacija, analiza rezultata i njihova vizuelizacija se vršila pomoću SDS programa verzija 2.4 na ABI 7900 HT Real Time PCR uređaju.

**Rezultati** ovog rada su obradjeni deskriptivnim i analitičkim statističkim metodama. Svi statistički podaci su grafički i tekstualno detaljno i jasno predstavljeni.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

**Zaključci** sažeto prikazuju i objedinjuju sve rezultate ovog rada. U ovoj studiji došlo se do sledećih značajnih zaključaka:

- potencijal ekspresije GAS5 može da ukaže na veličinu tumora samim tim i na raširenost bolesti
- ekspresija GAS5 je najniža u III stadijumu razvoja nesitnoćelijskog karcinoma pluća te je on značajan indikator za diferencijaciju zdravih od obolelih pacijenata u III stadijumu bolesti kada je ekspresija najmanja
- postoji značajna prediktivna vrednost za razlikovanje između kontrolne i eksperimentalne grupe ispitanika kasne faze bolesti sa senzitivnošću od 53% i specifičnosti od 79%.

**Literatura** koja je korišćena obuhvata spisak od 178 referenci.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

U ovoj studiji je učestvovalo 72 ispitanika od kojih je 57 imalo novodijagnostikovan karcinom pluća. Najveći procenat je bio muškog pola (72%) a prosečna starost ispitanika je bila 62 godine. Najveći procenat su bili pušači (91%). Takođe, najveći broj pacijenata bio je u I stadijumu bolesti (16). Vrednost ekspresije GAS5 je bila 0.65. Ukupno, pacijenti nisu imali značajno nižu ekspresiju GAS5 u odnosu na kontrolnu grupu. Na nivou naše studije, GAS5 se pokazao kao dobar parametar za uočavanje razlike između zdravih pacijenata i pacijenata u III stadijumu bolesti ( $p < 0,001$ ). Pacijenti sa nesitnoćelijskim tumorom pluća i metastazama u regionalnim limfnim čvorovima imali su značajno nižu ekspresiju GAS5 u poređenju sa pacijentima bez metastaza. Ovom "tečnom biopsijom" se pokazalo da GAS5 je imao dobre rezultate i kao prediktor veličine tumora, obzirom da su pacijenti sa tumorima većim od 3 cm imali značajno manju ekspresiju od pacijenata sa tumorima manjim od 3cm.

Rezultati naše studije koji pokazuju da GAS5 ekspresija opada kako raste T stadijum bolesti takođe su u skladu sa tumor supresornom funkcijom ove duge nekodirajuće RNK.

### **C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

U literaturi je na početku pronađeno da je ekspresija GAS5 smanjena kod solidnih tumora. Ekspresija GAS bila je u značajno negativnoj korelaciji sa veličinom tumora, stadijumom bolesti i prognozom pacijenta( Shi X, Sun M, Liu H, Yao Y, Kong R, Chen F, et al. A critical role for the long non-coding RNA GAS5 in proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer. *Mol Carcinog.* 2015;54(S1):E1–12. )

Kada je u pitanju karcinom dojke, GAS5 je povezan sa kontrolom apoptoze i njegova ekspresija je smanjena u ovoj bolesti(Schneider C, King RM, Philipson L.Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell.* 1988;54(6):787-93). Kada je u pitanju tumor želuca, smanjena ekspresija GAS5 povezana je sa povećanom proliferacijom ćelija i lošom prognozom(Sun M, Ji F Yan, Xia R, Kong R, Li J hai, Xu T peng, et al. Decreased expression of long noncoding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer. *BMC Cancer.* 2014; )

Polimorfizam duge nekodirajuće RNK GAS5 povezan je sa rizikom od hepatocelularnog karcinoma (Tao R, Hu S, Wang S, Zhou X, Zhang Q, Wang C, et al. Association between indel polymorphism in the promoter region of lnc RNA GAS5 and the risk of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 2015;) GAS5 je čak povezan sa pojavom metastaza i prognozom kod kolorektalnog karcinoma( Ma C, Shi X, Zhu Q, Li Q, Liu Y, Yao Y, et al. The growth arrest-specific transcript 5 (GAS5): a pivotal tumor suppressor long noncoding RNA in human cancers. *Tumor Biology.* 2016.)

Veća ekspresija GAS5 uočena je i u krvi pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća, u odnosu na zdravu populaciju u svojoj visokocitiranoj studiji, Liang et al (2016) pokazali su da je nivo GAS5 u plazmi pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća statistički značajno niži u odnosu na kontrole. Takođe, ekspresija GAS5 značajno je bila niža kod pacijenata u III i IV stadijumu bolesti u odnosu na I i II stadijum. U istraživanju ovih autora, nivo GAS5 dao je prilično dobre rezultate i u diskriminaciji između pacijenata i kontrola, kao i između pacijenata u različitim stadijumima bolesti, što je podvuklo ulogu GAS5 kao dijagnostičkog biomarkera, sa boljim karakteristikama od CEA.( Liang W, Lv T, Shi X, Liu H, Zhu Q, Zeng J, et al. Circulating long noncoding RNA GAS5 is a novel biomarker for the diagnosis of nonsmall cell lung cancer. *Med (United States).* 2016;).

Na nivou naše studije, uočeno je da slična studija pokazala je da su pacijenti u I stadijumu bolesti imali značajno nižu ekspresiju od zdravih . Razlika u GAS5 ekspresiji između naših pacijenata i kontrolne grupe nije bila značajna čak ni kada smo pacijente u I stadijumu bolesti podelili na one u IA i IB stadijumu. Jedno objašnjenje možda leži u malim grupama pacijenata u određenom stadijumu bolesti, dok postoji i mogućnost da je razlika koju su uočili Tan i saradnici 2017 god. u tumorskom tkivu nije jednaka razlici koju je moguće detektovati kada se GAS5 meri u plazmi periferne krvi GAS5 se pokazao kao dobar parametar za diskriminaciju između zdravih kontrola i pacijenata u III stadijumu bolesti ( $p < 0,001$ ) ( Tan Q, Zuo J, Qiu S, Yu Y, Zhou H, Li N, et al. Identification of circulating long non-coding RNA GAS5 as a potential biomarker for non-small cell lung cancer diagnosis. *Int J Oncol.* 2017;50(5):1729-38). Jedine dve studije koje su se bavile analizom cirkulišućeg GAS5 kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća pokazale su da ekspresija opada sa rastućim TNM stadijumom bolesti1. ( Liang W, Lv T, Shi X, Liu H, Zhu Q, Zeng J, et al. Circulating long noncoding RNA GAS5 is a novel biomarker for the diagnosis of nonsmall cell lung cancer. *Med*

(United States). 2016;2.( Kamel LM, Atef DM, Mackawy AMH, Shalaby SM, Abdelraheim N. Circulating long non-coding RNA GAS5 and SOX2OT as potential biomarkers for diagnosis and prognosis of non-small cell lung cancer. Biotechnol Appl Biochem. 2019; 170). Naša studija je pokazala slične rezultate, iako je najprominentniji pad viđen kod III stadijuma bolesti, u odnosu na I i II, ali i u odnosu na IV.

U ovoj studiji, GAS5 je imao dobre rezultate i kao prediktor veličine tumora, obzirom da su pacijenti sa tumorima većim od 3 cm imali značajno manju ekspresiju od pacijenata sa tumorima manjim od 3 cm. Ova tumor-supresorna karakteristika GAS5 je prepoznata u postojećoj literaturi (158, Wu Y, Lyu H, Liu H, Shi X, Song Y, Liu B. Downregulation of the long noncoding RNA GAS5-AS1 contributes to tumor metastasis in non-small cell lung cancer. Sci Rep [Internet]. 2016;6(March):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep31093171>).

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

Nataša Vešović, Nataša Tošić, Teodora Karan Djurašević, Zoran Andrić, Darko Zdravković, Sonja Pavlović, Dragana Jovanović. **Expression pattern of circulating long non-coding RNA GAS5 as a novel biomarker in non-small cell lung cancer patients.** Archives of Medical Science ISSN:1734-1922 DOI:<https://doi.org/10.5114/aoms.2020.98815> on line publish date 2020/09/09 M21 IF 2.807

#### **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija “Dijagnostički i prognostički značaj nivoa duge nekodirajuće RNK GAS5 u plazmi pacijenata obolelih od nesitnoćelijskog karcinoma pluća” predstavlja originalni naučni rad. Genetika u onkologiji je medicinska oblast koja se intenzivno razvija. Budućnost i dijagnostike ali i adekvatnog lečenja malignoma pluća su upravo ta genetska ispitivanja koja otkrivaju značajne genomske alteracije istovremeno razvijajući odgovarajuću ciljnu biološku terapiju. Ogroman rad je uložen na istraživanju molekularnih i genetskih aspekata raka pluća. Razumevanje biohemijskih procesa uključenih u patogenezu ovih malignoma je danas ključno za razvoj novih terapijskih strategija koji ciljano deluju na postojeće izmene na molekularnom nivou. U okviru tih ispitivanja uočena je niska ekspresija GAS5 kod lošijih prognostički karcinoma dojke, većih tumora želuca i kolorektalnih karcinoma i viših stadijuma bolesti karcinoma jetre i cerviksa. Ovaj doktorat je sagledao novu dimenziju u dijagnostici i prognozi pacijenata sa nelečenim karcinomom pluća a u odnosu na nivo ekspresije GAS5 u njihovoj plazmi. Stoga su dobijeni rezultati prikazani u ovom radu važni jer su pokazali, pre svega, prediktivnu vrednost za diskriminaciju između zdravih i obolelih u kasnijim stadijumima bolesti. Ekspresija GAS5 opada sa veličinom tumora kao i u odnosu na raširenu N bolest (bolest raširenu u limfnim žlezdama). Najniža ekspresija je uočena kod pacijenata u III kliničkom stadijumu bolesti tako da je GAS5 dobar biomarker za otkrivanje viših stadijuma maligne bolesti pluća. Takođe, u ovom istraživanju se uočio potencijal ekspresije GAS5 da može da ukaže na veličinu tumora. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima publikovanih studija (Tan Q, Zuo J, Qui S, Yu Y, Zhou H, Li N, et al. Identification of circulating long non-coding RNA GAS5 as a potential biomarker for non-small cell lung cancer diagnosis. Int. J. Oncol. 2017;50(5):1729–38)

Naša studija ukazuje da je snižena ekspresija cirkulirajućeg GAS5 značajno povezana sa veličinom tumora i TNM stadijumom, zato merenje nivoa ekspresije GAS5 u plazmi predstavlja potencijalni neinvazivni dijagnostički molekularni biomarker kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća, NSCLC.

U Beogradu 23.11.2020

**Mentor:**

Prof. dr Dragana Jovanović

**Komentor:**

Doc. dr Darko Zdravković

**Članovi komisije:**

1.Prof. dr Vesna Škodrić Trifunović

2.Doc. dr Milan Savić

3.Prof. dr Snežana Pajović