

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
STOMATOLOŠKOG FAKULTETA U BEOGRADU

Odlukom Nastavno-naučnog veća Stomatološkog fakulteta u Beogradu, donetom na III redovnoj sednici u školskoj 2013/2014. godini, održanoj 22.04.2014. godine, imenovani smo u komisiju za ocenu završene doktorske disertacije dr Draga Jelovca pod nazivom **ANALIZA ALTERACIJA ONKOGENA I TUMORSUPRESORNIH GENA U HISTOLOŠKI NEGATIVNIM MARGINAMA PLANOCELULARNIH KARCINOMA USNE DUPLJE**. Komisija u sastavu:

- Prof. dr Miroslav Vukadinović
- Prof. dr Branka Popović
- Prof. dr Ljiljana Luković, Medicinski fakultet u Beogradu

vrednujući rad kandidata na doktorskim studijama i na osnovu analize priloženog rukopisa disertacije, podnosi Nastavno-naučnom veću sledeći

I Z V E Š T A J

Mr Sci Dr Drago Jelovac rođen je 28. XII 1981.godine u Beogradu. Osnovnu i srednju školu završio je u Beogradu. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2000. godine, a diplomirao je 2005. godine sa prosečnom ocenom 9,62. Bio je i dobitnik nagrade za najboljeg studenta pete godine osnovnih studija za 2005. godinu sa prosečnom ocenom 10. Obavezni lekarski staž završio je 2007. godine, kada je položio stručni ispit za doktora stomatologije.

Poslediplomske studije je upisao 2005. godine na smeru Maksilofacijalna hirurgija a zvanje magistra stomatoloških nauka stekao je oktobra 2009. Dr Drago Jelovac zaposlen je od 2010. godine na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Drago Jelovac je 2011 godine upisao i Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu i trenutno pohađa, veoma uspešno 4. godinu studija.

U toku poslediplomskih studija kao istraživač je učestvovao u dva domaća i tri međunarodna projekta.

Za pokazano interesovanje u proučavanju oralnih karcinoma dr Jelovac dobio je plaketu Srpskog Lekarskog Društva i Medicinske Akademije Nauka za naučni doprinos, u prevenciji, ranoj dijagnostici i terapiji oralnog karcinoma.

Bio je član organizacionog odbora XII Kongresa maksilofacijalnih hirurga Srbije sa međunarodnim učešćem u Beogradu.

Za vreme studiranja bio je stipendista Republike Srbije, Grada Beograda. Dobitnik je stipendije Kraljevine Norveške. U toku poslediplomskih studija bio je stipendista Ministarstva Nauke Srbije.

Nastavno-naučno veće Stomatološkog fakulteta je 2010. godine donelo odluku o usvajanju predloga teme doktorske disertacije.

Mr Sci Drago Jelovac objavio je 16 naučnih radova, od kojih su 6 u međunarodnim časopisima (SCI lista). Koautor je dve monografije a održao je i tri predavanja po pozivu. Učestvovao je na domaćim i međunarodnim kongresima gde je prezentovano 50 naučnih radova u kojima je bio autor ili koautor.

Član je srpskog lekarskog društva (SLD-a) (sekcija za maksilofacijalnu hirurgiju i kliničku farmakologiju), međunarodnog udruženja oralnih i maksilofacijalnih hirurga (IAOMS-a), asocijacije za oseointegraciju i kraniomaksilofacijalnu hirurgiju (AO-CMF-a), balkanskog udruženja maksilofacijalnih hirurga (BAMFS-a), evropskog udruženja kraniomaksilofacijalnih hirurga (EACMFS-a).

Doktorska disertacija Mr Sci Draga Jelovca pod naslovom „ Analiza alteracija onkogena i tumorsupresornih gena u histološki negativnim marginama planocelularnih karcinoma usne duplje" napisana je na 135 strana sa 7 poglavlja: uvod, cilj, materijal i metodologija, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. Ilustrovana je sa 26 slika, a rezultati

su predstavljeni u 10 tabela i 17 grafikona. U ovoj doktorskoj disertaciji autor citira 217 bibliografskih jedinica.

U **Uvodu** disertacije kandidat daje **pregled literature** i razmatra anatomske, patohistološke i hirurške aspekte oralnog planocelularnog karcinoma. Ukazuje na posebnu važnost koju ovi tumori imaju u maksilofacijalnoj hirurgiji s obzirom na kompleksnost njihovih anatomskih struktura, modaliteta hirurškog lečenja i prognoze. Temeljno opisuje oralni planocelularni karcinom kao tumor sa najvećom učestalošću od svih malignih neoplazmi usne duplje, sa posebnim osvrtom na mogućnost recidiviranja i metastaziranja. U drugom delu **Uvoda** kandidat ističe značaj molekularne genetike u odgonetanju mehanizama tumorigeneze i objašnjava najosnovnije puteve maligne transformacije ćelije koji podrazumevaju aktivaciju onkogeni i inaktivaciju tumorsupresorskih gena. Temeljno je analizirana literatura koja se odnosi na alteracije gena uključenih u kontrolu ćelijske proliferacije, diferencijacije i maligne transformacije ćelije - tumorsupresornog gena TP 53 i onkogeni H-ras, c-myc i c-erb B2. Ističe značaj molekularno-genetičkog ispitivanja graničnog tkiva oralnog planocelularnog karcinoma, ističući da u literaturi postoje brojni dokazi koji potvrđuju da je prisustvo malignih ćelija u hirurškim marginama u direktnoj vezi sa povećanim rizikom za razvoj recidiva bolesti kao i manjom stopom preživljavanja. Kandidat navodi da za sada ne postoje jedinstveni kriterijumi koji definišu šta je „čista“ odnosno histološki negativna hirurška margina kod oralnog planocelularnog karcinoma kao i da u literaturi ima mnogo kontradiktornih podataka vezanih za uticaj statusa margina na ishod hirurškog lečenja zbog ograničenog dometa histopatološke analize. Nedostatak većine studija koje se bave ovom problematikom je relativno mali broj pacijenata uključenih u analizu što vodi nepouzdanosti statistici. Iz tog razloga teško je donositi čvrste zaključke o značaju molekularnog statusa margina. Nedostatak pomenutih studija je i taj da se većina njih bavi gotovo isključivo ispitivanjem mutacionog statusa TP53 gena, umesto da se paleta gena proširi s obzirom na kompleksnost procesa kancerogeneze.

Sve navedeno je poslužilo kao **polazna osnova** za radnu hipotezu o postojanju povezanosti genetičkih alteracija u hirurški negativnim marginama i nepovoljnog toka i ishoda bolesti (pojave recidiva, kraće stope petogodišnjeg preživljavanja i dr).

Osnovni **cilj** doktorske disertacije dr Draga Jelovca bio je određivanje molekularno-genetičkog statusa histološki negativnih margina oralnog planocelularnog karcinoma, kroz analizu mutacija gena koji igraju ključnu ulogu u malignoj transformaciji ćelije, i utvrđivanje značaja molekularno-genetičkog statusa u proceni ishoda lečenja. Iz osnovnog cilja doktorske disertacije, proizašli su zadaci istraživanja:

- 1) Utvrditi učestalost tačkastih mutacija u egzonima 5 i 7 **TP53 gena** u histološki negativnim marginama OPK
- 2) Utvrditi učestalost tačkastih mutacija u kodonima 12 i 13 **H-ras** gena u histološki negativnim marginama OPK
- 3) Analizirati prisustvo amplifikacije **c-erbB2** gena u histološki negativnim marginama OPK
- 4) Analizirati prisustvo amplifikacije **c-myc** gena u histološki negativnim marginama OPK
- 5) Utvrditi stepen povezanosti promena u molekulu DNK sa anamnestičkim parametrima, stadijumom bolesti, histološkim gradusom, dubinom invazije, recidivima i stopom preživljavanja

Za ostvarivanje postavljenih ciljeva i zadataka kandidat je koristio savremenu **metodologiju**. Istraživanje u vidu prospektivne studije je obuhvatilo 50 pacijenata sa histopatološki verifikovanim oralnim planocelularnim koji su operisani na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu tokom 2007 i 2008 godine. Analizirani su anamnesički, klinički, histopatološki i epidemiološki parametri. U anamnesičkim parametrima obrađena je porodična anamneza i lična anamneza, period od prvih subjektivnih tegoba do operativnog zahvata i loše navike. Porodična anamneza na

karcinome je zabeležena kao pozitivna samo u prvoj liniji srodstva. Analizirani klinički parametri bili su: precizna lokalizacija tumora; veličina tumora; prisustvo uvećanih limfnih čvorova vrata i TNM klasifikacija.

Histopatološka analiza podrazumevala je: histološki gradus tumora; dubinu invazije tumora; histopatološku analizu limfnih čvorova vrata. U postoperativnom toku određena je stopa petogodišnjeg preživljavanja i učestalost recidiva.

Posle uklanjanja tumora eksidirano je granično tkivo sa najmanje jednog mesta oko tumora. Materijal je prosleđivan u histopatološku laboratoriju Stomatološkog fakulteta. Kada je histopatološka verifikacija pokazala da u graničnom tkivu nema prodora malignih ćelija, pristupalo se daljoj molekularno genetičkoj analizi „graničnog tkiva“. Molekularno genetička analiza vršena je na uzorku graničnog tkiva perifernije od linije resekcije. Prilikom ekscizije graničnog preparata, na uputu za histopatološki pregled obeležavana je precizna lokalizacija ekscidiranog graničnog preparata.

Molekularno genetičko istraživanje je obavljeno u Laboratoriji za molekularnu genetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu i obuhvatilo je sledeće postupke: izolaciju DNK iz svežeg tkiva; reakciju lančanog umnožavanja ciljnih segmenata gena (PCR-polymerase chain reaction); skrining mutacija u TP53 i H-ras genima PCR- SSCP metodom (konformacioni polimorfizam jednolančane DNK); analiza amplifikacije c-myc i c-erb B2 gena metodom diferencijalnog PCR-a i real-time PCR; mutacije detektovane SSCP metodom potvrđene su sekvenciranjem.

Rezultati su prikazani u skladu sa standardima za ovu vrstu naučno-istraživačkog rada i statistički obrađeni odgovarajućim testovima. Sistematično su opisane epidemiološke, kliničke i patohistološke karakteristike oralnog planocelularnog karcinoma kao i izloženost pacijenata različitim etiološkim faktorima. Detaljno i postupno se opisuje distribucija mutacija u histološki negativnim marginama. Rezultati testova detaljno prikazuju korelaciju anamnestičkih, kliničkih, histopatoloških i genetičkih parametara u odnosu na ishod bolesti. Kandidat ističe da je petogodišnje preživljavanje pacijenata sa mutiranim c-erb B2 genom u histološki negativnoj margini statistički značajno kraće u odnosu na pacijente kod kojih nije identifikovana ta mutacija, što je prikazano Kalpan

Majerovim testom. Razlike u krivama preživljavanja su određene *long-rank* testom. Povezanost mutacija sa anamnestičkim, kliničkim i histološkim parametrima, stopom recidiva i stopom petogodišnjeg preživljavanja podrobno je objašnjena.

Upoređujući svoje rezultate sa rezultatima drugih istraživača koji su bili dostupni, autor u **Diskusiji** izlaže saznanja i činjenice koje doprinose ukupnom razumevanju postavljenog problema. Vrlo temeljno poredi sopstvene rezultate dobijene analizom mutacija TP53 gena sa literaturnim podacima. Treba posebno naglasiti da se genetičkom alteracijom onkogenih H-ras, c-myc i c-erb B2 u oralnim planocelularnim karcinomima malo istraživača bavilo, a podaci o promenama ovih gena u marginama uopšte nisu nađeni u naučnoj literaturi. Ovo je prvi rad koji se bavi analizom mutacija pomenutih onkogenih u histološki negativnim marginama planocelularnog karcinoma usne duplje, pa je i poređenje rezultata ove doktorske disertacije sa rezultatima drugih istraživača bilo nemoguće, ali i značaj istraživanja utoliko veći.

Zaključci istraživanja su jasno formulisani i pružaju odgovore na postavljene ciljeve. Od svih ispitanih kancerskih gena, c-myc onkogen pokazuje najveću učestalost mutacija u histološki negativnim marginama. Vrednost od 30%, ukazuje na njegovu važnu ulogu u razvoju planocelularnog karcinoma. Mutacije u tumor supresornom genu TP53 zabeležene su u hirurški negativnoj margini planocelularnog karcinoma kod 22% bolesnika, što je u skladu sa dosadašnjim istraživanjima. Mutacije u H-ras genu ustanovljene su u hirurškim marginama tumora kod svega 12% pacijenata, drugim rečima to je od svih analiziranih gena najređe mutiran gen u uzorku tumorskih margina. Amplifikacija c-erbB2 onkogenih zabeležena je u 22% uzoraka. Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa amplifikacijom c-erbB2 gena u histološki negativnim marginama je statistički značajno kraće u odnosu na pacijente kod kojih nije identifikovana ova promena. Pacijenti kod kojih je identifikovana amplifikacija c-erb B2 gena u histološki negativnim marginama statistički značajno češće razvijaju recidiv u postoperativnom toku.

S obzirom na statistički značajno veću učestalost recidiva i kraće petogodišnje preživljavanje kod pacijenata sa prisutnom amplifikacijom u c-erb B2 genu u histološki negativnoj margini OPK, kandidat smatra da te pacijente treba znatno češće kontrolisati u

postoperativnom periodu. Na osnovu dobijenih rezultata, mutacije c-erb B2 gena se mogu svrstati u grupu negativnih prediktora planocelularnog karcinoma usne duplje.

Literatura je sveobuhvatna i savremena. Sadrži 217 jedinica relevantnih za ovu doktorsku disertaciju.

Zaključak

Doktorska disertacija Mr Sci Draga Jelovca predstavlja dobro dokumentovanu prostpektivnu studiju koja daje doprinos u oblasti proučavanja molekularno-genetičkih mehanizama oralnog planocelularnog karcinoma. Ovo istraživanje je pokazalo sa kojom učestalošću se javljaju alteracije u genima TP53, c-myc, c-erb B2 i H- ras, u tumorskim marginama koje se klinički i histopatološki smatraju zdravim tkivom i kakva je njihova povezanost sa kliničkim parametrima. Pacijente u čijim marginama su detektovane genske promene, neophodno je pratiti u dužem periodu i kroz učestalije kontrole, a molekularno-genetička analiza bi mogla biti uvedena u svakodnevnu kliničku praksu. Kod oralnog planocelularnog karcinoma, potencijalni marker mogao bi da bude c-erb B2 koji je povezan sa nekoliko kliničkih parametara. S obzirom na njegovu visoku ekspresiju u tumorima glave i vrata, i na ulogu receptora u važnoj onkogenoj signalizacionoj kaskadi, on bi istovremeno mogao da bude i jedna od meta u tumorskoj terapiji. Disertacija predstavlja doprinos u pronalaženju optimalnog biološkog markera koji bi mogao biti uveden u kliničku praksu. Kompleksnost teme ove disertacije i dobijeni rezultati ukazuju na zrelost i ozbiljnost kandidata. Postavljeni ciljevi istraživanja su sistematično proučeni primenom adekvatnih naučnih metoda. Rezultati su precizno obrađeni i logično protumačeni, u skladu sa postavljenim ciljevima, a Diskusija je detaljna i sveobuhvatna a ipak vrlo jasna.

Uvidom u dostavljeni tekst, komisija u sastavu Prof dr Miroslav Vukadinović, prof dr Branka Popović, prof dr Ljiljana Luković ocenila je da doktorska disertacija Mr Sci dr Draga Jelovca pod nazivom: **“Analiza alteracija onkogenih i tumorsupresornih gena u histološki negativnim marginama planocelularnih karcinoma usne duplje”** predstavlja samostalno, originalno i dobro dokumentovano istraživanje. Doktorska disertacija zadovoljava sve kriterijume propisane pozitivnim normama sadržanim u Zakonu o Univerzitetima i Stomatološkog fakulteta u Beogradu.

Na osnovu iznetog, predlažemo Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta da prihvati izveštaj i odredi datum javne odbrane ove doktorske disertacije.

KOMISIJA

U Beogradu

Prof dr Miroslav Vukadinović

29.12.2014.

Prof dr Branka Popović

Prof dr Ljiljana Luković

Medicinski fakultet, Univerziteta u

Beogradu