

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 07.03. 2016. godine, broj 5940/3 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„ Prediktivni zna aj individualnih i klini kih karakteristika osoba sa adenokarcinomom prostate na rizik za nastanak akutne i kasne toksi nosti nakon zra ne terapije“

kandidata mr sc dr Vesne Stankovi , zaposlene u Institutu za Onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu, kao lekar specijalista radiologije. Mentor je Doc dr Marina Nikitovi .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof.dr Zoran Džami , vanredni profesor Medicinskiog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, Klinika za urologiju KCS,
2. Prof. dr o ije Šaranovi , profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu Centar za Radiologiju i Magnetnu rezonancu KCS, Odsek za Digestivnu radiologiju,
3. Dr sci VNS Radmila Jankovi , Institut za Onkologiju i Radiologiju Srbije, Odeljenje za Eksperimentalnu Onkologiju, Laboratorija za molekularnu genetiku.

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicnskog fakulteta slede i

## IZVEŠTAJ

### A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci Vesne Stankovi napisana je na 180 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, bolesnici i metodologija istraživanja, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 5 slika, 25 grafikona i 72 tabele. Doktorska disertacija sadrži podatke o komisiji, sažetak na srpskom i engleskom jeziku i biografiju kandidata

U **uvodu** su definisani individualni i klinički parametri koji mogu uticati na pojavu akutne i kasne toksikozne terapije kao i hipoteza o potencijalnom značaju individualne genske osetljivosti na moguće komplikacije zračne terapije

Što je veći volumen zdravog tkiva koji prima visoke doze zračenja, to je i uestalost težih komplikacija veća tzv. efekat volumena zračenja. Koji su to dozvoljeni volumeni za određene doze a da pri tome bude prihvatljiv nivo toksikoznosti još uvek je otvoreno pitanje.

Rezultati studija koji su se bavili ovom problematikom pokazali su da je osim efekta volumena zračenja na uestalost komplikacija zračne terapije mogli da utiču i klinički parametri kao što su primena androgene deprivacije, prisustvo komorbiditeta (hemoroidi, diabetes mellitus, arterijska hipertenzija), primena antikoagulantne i antiagregacione terapije kao i prethodne abdominalne operacije.

Primenjeno je da među pacijentima koji imaju povoljne dozimetrijske parametre ipak dolazi do ispoljavanja kasne toksikoznosti  $gr > 2$  kao i da među onima sa nepovoljnim dozimetrijskim parametrima ima onih kod kojih se nije ispoljila kasna toksikoznost  $gr > 2$ .

Iz tog razloga postavljena je hipoteza o potencijalnom značaju individualne osetljivosti na moguće komplikacije zračne terapije. U poslednjih 10 tak godina je ispitano oko 60 gena kao mogućih faktora koji utiču na ispoljavanje osetljivosti zdravih organa na zračnu terapiju, ali se

nijedan od njih još uvek nije izdvojio kao gen odgovoran za povećanu radiosenzitivnost ili radiorezistentnost zdravih tkiva

**Ciljevi rada** su precizno definisani.

Sastoje se u izračunavanje stope incidencije akutne i kasne genitourinarne (GU) i gastrointestinalne toksikoznosti (GI) u uzorku pacijenata sa adenokarcinomom prostate nakon primenjene zračne terapije 3D konformalnom tehnikom.

Analizirana je korelacija ispitivanih individualnih i kliničkih karakteristika pacijenata, dozimetrijskih parametara terapijskog plana sa učestalosti akutne i kasne GU i GI toksikoznosti.

Ispitivana je prediktivna vrednost individualnih karakteristika (uzrast, pušački status, genska ekspresija) osoba sa adenokarcinomom prostate na rizik za nastanak simptoma akutne i kasne GU i GI toksikoznosti.

Takođe je ispitivana prediktivna vrednost kliničkih karakteristika (predhodne operacije abdomena, prisustvo komorbiditeta) osoba sa adenokarcinomom prostate na rizik za nastanak simptoma akutne i kasne GU i GI toksikoznosti kao i prediktivna vrednost dozimetrijskih parametara terapijskog plana (V50, V60, V65, V70, V72), srednja i maksimalna doza na rektum i mokraćnu bežiku)

U poglavlju **Bolesnici i metodologija istraživanja** navedeno je da su bolesnici ležali u Klinici za radiološku onkologiju i dijagnostiku Instituta za Onkologiju i Radiologiju Srbije a da je određivanje ekspresije gena urađeno u Laboratoriji za molekularnu genetiku Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za Onkologiju i Radiologiju Srbije. Sve eksperimentalne procedure su bile odobrene od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu u skladu sa Helsinškim principima i sprovedene nakon potpisivanja pristanka od strane pacijenta nakon obavestavanja o ciljevima istraživanja.

Precizno su opisani kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz studije i precizno definisane doza-volumen grupe. Detaljno je opisano planiranje i sprovođenje 3DCRT kao i na in pra enja i EORTC/RTOG kriterijumi za ocenjivanje akutne i kasne GU i GI toksikoznosti.

U metodologiji rada je opisana i genetska analiza. Precizno su navedeni na in i izolacije limfocita iz periferne krvi, izolacija RNK i reverzna transkripcija. Za izolaciju

limfocita koriš en je limfoprep (*Histopaque-1077, Sigma*) centrifugiranjem pomo u gradijenta gustine. Proces izolacije RNK izvršen je klasi nim metodom izolacije RNK (Chomczynski i Sacchi,1987). isto a i koncentracija RNK analizirana je spektrofotometrijski uz pomo aparata *BioSpec-nano (Shimadzu)*. Metoda reverzne transkripcije, kojom se izolovana RNK prevodi u cDNK, izvršena je prema uputstvu proizvo a a kita koji je koriš en (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems*). Za merenje nivoa ekspresije *RAD23B, TG 1, SRF, DRAP1 i DDX17* gena u uzorcima krvi pacijenata koriš ena je metoda kvantitativne polimerazne reakcije u realnom vremenu (*engl. quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR*) sa komparativnom ddCt analizom.

Detaljno je opisana metodologija odre ivanja ekspresije *RAD23B, TG 1, SRF, DRAP1 i DDX17* gena koriš enjem *TaqMan* tehnike (protokol po uputstvu *TaqMan Universal PCR Master Mix (2X), Applied Biosystems*). Nivoi ekspresije navedenih gena mereni su na 7500 *Real-time PCR* aparatu (*Applied Biosystems*). Navedena je i formula po kojoj je izra unata relativna vrednost koli ine ekspresije ciljnog gena.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

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

**Zaklju ci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Koriš ena **literatura** sadrži spisak od 320 referenci.

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

Incidenca akutne UG toksi nosti gradus 1 je 53(56.4%), gradus 2 je 25(26.5%) gradusa 2je18(19.1%) gradus 3 je 7 (7.4%) . Kumulativni rizik za kasnu UG toksi nost gradus 1 nakon 2 godine pra enja je 25.3% a nakon 3god. 30.2% (mediana pra enja 27meseci). Nije bilo statisti ki zna ajne razlike u u estalosti u odnosu na Doza volumen grupe P i P+SV.

Odre ivana je prediktivna vrednost ispitivanih parametara na rizik za nastanak simptoma akutne i kasne GU i GI toksi nosti. Nakon formiranja Osnovnog modela koji je obuhvatao slede e parametre:Doza-volumen grupa, D max i V72 utvr eno je da su statisti ki zna ajni prediktori za akutnu GU toksi nost gradus 2 bili aktivno pušenje, prethodne

operacije u abdomenu i maloj karlici i diuretici dok je za kasnu GU toksi nost 1 bilo prisustvo akutne UG toksi nosti. Diabetes mellitus je imao grani nu zna ajnost za predikciju kasne UG toksi nosti gradus 1

Incidenca akutne GI toksi nosti gradusa 1 iznosila je 41 (43.6%). Incidenca kasne GI toksi nosti gradusa 2 je 9 (9.54%) pri emu je 7(7.4%) imalo simptome gradusa 2 i 2 (2.13%) gradusa 3.

Nakon formiranja tzv Osnovnog modela koji je obuhvatao slede e parametre: godine života, hormonska terapija, Doza volumen grupa, D max i V72 utvr eno je da bi mogu i faktori predikcije akutne GI mogli biti konzumacija alkohola, hemoroidi, hroni na GI oboljenja, prethodne operacije u abdomenu i/ili maloj karlici, V60, V65, V70 mogli biti faktori predikcije akutne GIT. MVA analiza spomenutih faktora je pokazala da su jedino hemoroidi i hroni na GI oboljenja statisti ki zna ajni prediktori za akutnu GI toksi nost. Mogu i faktori predikcije za kasnu GI toksi nost su bili hemoroidi i antiagregaciona th dok je MVA pokazala da su samo hemoroidi bili zna ajni prediktori za kasnu GI toksi nost.

Ispitivanjem korelacije pet ispitivanih gena sa pojavom akutne i kasne bilo GU bilo GI toksi nosti nije utvr ena statisti ka zna ajnost ni za jedan od pet ispitivanih gena ali je korelacijom ispitivanih gena sa rizikom za infiltraciju semenih vezikula utvr ena statisti ki zna ajna korelacija sa genom DDX17 koji bi mogao biti prognosti ki faktor za agresivnije forme bolesti.

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

Incidenca akutne UG toksi nosti nakon TD72Gy primenom 3D konformalne zra ne terapije karcinoma prostate u ovom radu za gradus 2 iznosila 19.1% a za gradus 3 je bila 7.4% , pri emu nije bilo razlike u u estalosti u odnosu na dve Doza volumen grupe P I P+SV. Rezultati su sli ni rezultatima multicentri ne studije u grani u kojoj su pacijenti primili srednju TD71.6Gy Michalski I sar (2000) u kojoj je u grupi P u estalost za gradus 2 bila 17% a grupu P+SV 31% dok je za gradus 3 u grupi P bila 1% a u grupi P+SV bila 2%.

Kumulativni rizik za kasnu UG toksi nost gradus 1 nakon 2 I 3 god je u ovom istraživanju iznosio 25,3% I 30.2% što je sli no rezultatima randomizovane studije u kojoj je kasna UG toksi nost gradus 2 nakon 3 god u grupi koja je primila 68Gy bila 28.5% a u grupi koja je primila 78Gy bila 30.2%. (Peeters I sar 2005). U oba istraživanja nije bilo razlike u u estalosti kasne UG toksi nosti u odnosu na Doza volumen grupe P vs P+SV.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je aktivno pušenje snažan prediktor akutne UG toksi nosti gradusa 2. Obzirom da je kao rezultat ovog istraživanja dobijeno da je pojava akutne UG toksi nosti snažan prediktor kasne UG toksi nosti što je u saglasnosti sa istraživanjem Jereczek-Fossa BA et al. (2010) može se o ekivati da bi se u dužem vremenskom pra enju na ve em broju bolesnika utvrdila i korelacija pušenja sa kasnom UG toksi noš u sto je u saglasnosti sa rezultatima Solanki AA and al. (2013) koji su pronašli zna ajnu korelaciju aktivnog pušenja sa pojavom kasne UG toksi nosti.

Diabetes mellitus je u ovom istraživanju bio u zna ajnoj korelaciji sa u estaloš u akutne UG toksi nosti I pokazao se kao prediktor kasne UG toksi nosti sa grani nom statisti kom zna ajnoš u ( $p=0.56$ ) što je u saglasnosti sa rezultatima Kalakota K and Liauw SL(2013) koji su analizirali pojavu toksi nosti nakon zra ne terapije karcinoma prostate u bolesnika sa Diabetes mellitusom. Iako nijedan od do sada objavljenih radova nije ukazao na korelaciju prethodnih operacija sa UG toksi noš u postoje radovi koji govore u prilog pove anog rektalnog krvarenja u pacijenata na zra noj terapiji karcinoma prostate eskaliranim dozama (Valdagni R et al.2012) U ovom istraživanju nije ra ena korelacija simptoma (rektalno krvarenje) sa faktorima predikcije zbog malog broja doga aja ve je ra ena

predikcija u odnosu na sve simptome akutne i kasne GI toksikozne gradusa 1 i prethodne operacije su bile u značajnoj korelaciji sa učestalošću akutne GI toksikozne gradusa 1.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da bi pored dozimetrijskih parametara V60, V65 i V70 i klinički parametri kao što su hemoroidi, prethodne operacije u abdomenu i maloj karlici mogli biti prediktori za pojavu akutne GI što je u korelaciji sa rezultatima koje su objavili Vavassori V i sar (2007) i Valdagni R i sar (2008) mada je u njihovim radovima Dmean za rectum naj snažniji prediktor akutne GI toksikozne što nije potvrđeno u ovom istraživanju. U nedavnom istraživanju Schmid i sar (2012) kasna rektalna toksikozna značajno korelira sa gastrointestinalnim komorbiditetima kao što su hemoroidi, divertikuloza i polipi u debelom crevu ali nije nađena korelacija sa dozimetrijskim parametrima. Ova istraživanja su u saglasju sa dobijenim rezultatima ove doktorske disertacije koji pokazuju da su hronična GI oboljenja prediktor pojave akutne GI dok su hemoroidi naj snažniji klinički faktor predikcije kako za akutnu tako i za kasnu GI toksikoznu.

Valdagni R i sar. (2009) su u svom istraživanju pokazali je da su četiri gena DDX17, DRAP1, RAD23 i SRF imali značajno različite ekspresije gena u grupi pacijenata koja je ispoljila toksikoznu u odnosu na pacijente koji nisu imali neželjena dejstva. Takođe je pokazano u radu De Langhe, et al.(2013) da su neke alteracije TGF- $\beta$ 1 gena povezane sa akutnim i kasnim toksikoznim UG reakcijama na jonizujuće zračenje. Zbog navedenih istraživanja je ovaj set gena izabran za kandidat-gen studiju ali rezultatima ovog istraživanja nije potvrđena korelacija ekspresije ovih gena sa pojavom ni UG ni GI toksikozne što je u saglasnosti sa nedavno objavljenim radom Barnett et al (2015) u kome se navodi da male kandidat gen studije nisu pronašle značajne prediktore radioindukovane toksikozne zbog čega

se stvara novi pristup kojim se istražuju celi genomi ili selektovani genski paneli tzv GWAS studije. DDX17 gen bi prema rezultatima ovog istraživanja mogao biti prognosti ki parameter agresivnije forme bolesti u skladu sa istraživanjima Fuller Pace et al. (2011) I Clark EL et al (2008)

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

**1. Stankovic V, Nikitovic M, Pekmezovic T, Kisic Tepavcevic D, Saranovic Dj, Djuric-Stefanovic A, Saric M.** Toxicity of the lower gastrointestinal tract and its predictive factors after 72Gy conventionaly fractionated 3D conformal radiotherapy of localised prostate cancer . J of BUON 2016; Vol 21 No. 5 .

#### **E) Zaključak (obrazloženje nau nog doprinosa)**

**Doktorska disertacija „ Prediktivni zna aj individualnih i klini kih karakteristika osoba sa adenokarcinomom prostate na rizik za nastanak akutne i kasne toksi nosti nakon zra ne terapije“**

dr Vesne Stankovi predstavljaju originalni nau ni doprinos. Navedeni rezultati ove doktorske teze potkrepljuju pretpostavku da osim parametara zra ne terapije na pojavu akutnih i kasnih komplikacija zra ne terapije uti e i niz drugih individualnih i klini kih faktora: kao što su aktivno pušenje, prethodne operacije u abdomenu i maloj karlici, diabetes mellitus i upotreba diuretika na pojavu urogenitalne akutne i kasne toksi nosti. Tako e je utvr ena statisti ki zna ajna povezanost pojave simptoma kasne urogenitalne toksi nosti u pacijenata koji su imali simptome akutne urogenitalne toksi nosti. Na pojavu akutne i kasne gastrointestinalne toksi nosti osim parametara zra ne terapije uticali su individualni faktori kao što su konzumiranje alkohola, a od klini kih parametara prisustvo hemoroida, hroni na gastrointestinalna oboljenja, prethodne operacije u abdomenu i maloj karlici.



Pacijenti sa prisutnim prediktivnim faktorima za komplikacije transkutane zra ne terapije se mogu uputiti na druge modalitete le enja (brahiterapija, hirurgija,aktivno pra enje) ili se pri planiranju zra ne terapije mora voditi ra una o visini terapijske doze i moraju se primeniti strožija ograni enja doze na zdrave organe.Iako nije pokazana korelacija ispitivanih 5 pojedina nih gena sa pojavom kasne urogenitalne i gastrointestinalne toksi nosti, date su smernice za dalja ispitivanja celog genoma ili selektovanog panela gena u okviru novog pristupa u istraživanju engl. GWAS . U toku ovog istraživanja se došlo do interesantnih rezultata koji ukazuju da bi gen DDX17 mogao biti prognosti ki faktor agresivnije forme bolesti što bi trebalo dokazati na ve oj grupi pacijenata. Date su smernice za dalja istraživanja u smislu daljeg upore ivanja nivoa ekspresije ovog gena izme u zdravog i tumorskog tkiva što bi podržalo potencijalni prognosti ki potencijal DDX17 gena

Ova doktorska disertacija je ura ena prema svim principima nau nog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaklju ci.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Vesne Stankovic i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Ilanovi Komisije:

Mentor:

Prof. dr Zoran Džami

Doc. dr Marina Nikitovi

Prof. dr or ije Šaranovi

Dr sci VNS Radmila Jankovi