

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16-AC imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Molekularno-genetički mehanizmi rezistencije u prognozi bolesnika sa multiplim mijelomom”**

kandidata dr Aleksandre Sretenović, zaposlene u Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentor je Prof. Dr Jelena Bila.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Biljana Mihaljević, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. Dr Milena Todorović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Naučni savetnik, Sonja Pavlović, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije**

Doktorska disertacija dr Aleksandre Sretenović napisana je na ukupno 64 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 11 tabela, 3 grafikona i 8 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji.

U **uvodu** je data definicija multiplog mijeloma, etiološki faktori od značaj za nastanak bolesti, pregled kliničke slike, revidirani kriterijumi za postavljanje dijagnoze multiplog mijeloma od strane Internacionalne radne grupe za mijelom (IMWG), analiza različitih prognostičkih faktora u multiplom mijelomu koja je rezultirala 2005. godine formiranjem internacionalnog prognostičkog indeksa- International Staging System (ISS). Takođe, naglašeno je da su citogenetske abnormalnosti detektovane metodom intrefazne fluorescentne

in situ hibridizacije (iFISH) glavni prognostički faktor u multiplom mijelomu. Kombinovanjem ovih citogenetskih abnormalnosti koje su detektovane metodom iFISH, sa klasičnim ISS skorom i vrednostima laktat-dehidrogenaze (LDH) koja je značajan biomarker u multiplom mijelomu i ukazuje na stepen agresivnosti bolesti, kreiran je 2015. godine od strane IMWG tzv. revidirani internacionalni stejdžing sistem za multipli mijelom- R-ISS. Poseban deo je posvećen lečenju multiplog mijeloma. Savremeno lečenje zasnovano je na prognostičkom profilu bolesnika i odabiru optimalnog terapijskog modaliteta sa ciljem da se postigne stabilna i dugotrajna kompletna remisija. U zavisnosti od godina života bolesnika, opšteg stanja, i pridruženih bolesti kreira se terapijski pristup.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Sastoje se od utvrđivanja uticaja postojanja molekularno-genetičkih aberacija: del1p, +1q21, del17p, t(4;14) i t(14;16) na terapijski odgovor i dužinu preživljavanja bolesnika sa multiplim mijelomom.

Takođe kao cilj rada navedeno je i utvrđivanje uticaja ekspresije cereblona (CRBN), MDR1 i LRP na terapijski odgovor i dužinu preživljavanja bolesnika sa multiplim mijelomom.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka u koju su uključena 92 novootkrivena konsekutivna bolesnika sa multiplim mijelomom, koji su dijagnostikovani i lečeni u Klinici za hematologiju KCS u periodu od januara 2010. do januara 2014. godine. Dijagnoza multiplog mijeloma kod ispitanika je postavljena u skladu sa kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije. Navedena ispitivanja sprovedena su u Laboratoriji za citogenetiku i molekularnu genetiku Klinike za hematologiju Kliničkog centra Srbije i pri Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGG) u Beogradu. U Laboratoriji za citogenetiku Kliničkog centra Srbije metodom iFISH (interfazna fluorescentna *in situ* hibridizacija) urađena su ispitivanja prisustva delecije del1p i dodatnih kopija hromozoma 1q21, del17p, t(4;14), i t(14;16). Analiza je urađena iz uzorka mononuklearnih ćelija koštane srži bolesnika (6-10 ml), na selektovanoj populaciji CD138+ plazmocita. Separacija malignih plazmocita vršena je pomoću CD138 magnetnih partikula, prema preporukama proizvođača (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Suspenzija izolovanih plazmocita se nanosi na mikroskopska stakla, na kojima se potom primenjuje FISH protokol za analizu interfaznih jedara. Prisustvo aberacija utvrđuje se analizom 100 ili više interfaznih jedara, za svaki ispitivani genski region. Analiza jedara se vrši pomoću mikroskopa OlympusBX51 opremljenog fluorescentnom lampom i pojedinačnim band pass filterima. Slikanje

fluorescentnih signala je omogućeno Olympus U-CMAD3 fluorescentnom kamerom (Olympus, Germany), povezanom sa Cytovision programom za obradu slika.

U Laboratoriji za molekularnu biomedicinu pri IMGG, molekularno-genetička ispitivanja su sprovedena na izolovanim mononuklearnim ćelijama iz aspirata koštane srži. Za izolaciju mononuklearnih ćelije koristi se metoda izolacije na gradijentu Ficoll-a. Za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija koristi se TRIzol® (Invitrogen). TRIzol® predstavlja monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, a sam proces izolacije predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK definisan od strane Chomczynski P & Sacchi N (Chomczynski P & Sacchi N, 1987). Po izolaciji, RNK se čuva na  $-80^{\circ}\text{C}$  do sprovođenja molekularno-genetičkog ispitivanja. Iz RNK metodom reverzne transkripcije vrši se sinteza komplementarne DNK (c-DNK). Za detekciju t(4;14) fuzionih transkripata koristi se RT-PCR metoda. Utvrđivanje ekspresije MDR1, LRP i CRBN gena sprovodi se pomoću „real-time“ PCR (q-PCR) metode. Relativna ekspresija gena kod pacijenata određena je poređenjem sa ekspresijom kod zdravih kontrola. U slučaju ispitivanja ekspresije MDR1 i LRP gena primenjena je SYBR Green hemija, dok je prilikom određivanja ekspresije CRBN gena korišćena TaqMan hemija. U poglavlju materijal i metode dat je detaljan opis iFISH i PCR protokola koji su korišćeni u ovom ispitivanju.

U cilju statističke obrade podataka korišćene su metode deskriptivne statistike, metode za procenu značajnosti razlike, kao i analiza preživljavanja po Kaplan-Meier metodi.

Ova studija je odobrena od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

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.

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od **80** referenci.

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

Metodom iFISH prisustvo visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti: t(4;14), t(14;16), del 17p utvrđeno je kod 14 (15,2%) bolesnika. Kod 27 (29,3%) bolesnika utvrđeno je prisustvo abnormalnosti hromozoma 1. Kod 8 (8,7%) bolesnika delecija 1p, a kod 19 (20,6%) dodatne

kopije hromozoma 1q. Kod 4 (4,34%) bolesnika bila je prisutna hiperdiploidija +1q. Bolesnici sa abnormalnostima hromozoma 1 su se karakterisali kraćim trajanjem remisije na granici statističke značajnosti i jasno kraćim preživljavanjem u odnosu na bolesnike bez ovih abnormalnosti. Medijana ekspresije CRBN kod bolesnika sa MM je bila značajno viša u odnosu na zdravu kontrolu. Korelacija između visoke ekspresije CRBN i povoljnog terapijskog odgovora bila je prisutna u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom, što je u skladu sa podacima iz literature, te visoka ekspresija CRBN može da posluži kao surogat marker za bolest niskog rizika. Analiza nivoa ekspresije RQ\_MDR1 pokazala je da je njena vrednost bila niža kod bolesnika koji su reagovali na lečenje  $252.1 \pm 46.2$  u odnosu na one koji su umrli  $493.8 \pm 168.$ , ali T testom nije postignuta statistička značajnost ( $p=0,233$ ). Slični rezultati su dobijeni i od RQ\_LRP  $181.9 \pm 31.5$  prema  $242.5 \pm 33.8$ , takođe bez postizanja statističke značajnosti ( $p=0,213$ ).

Koristeći Kaplan-Meier analizu preživljavanja potvrdili smo prognostički značaj ISS skora i povišene vrednosti LDH na PFS i OS. Bolesnici sa visokorizičnim CA su imali lošiji PFS i OS u poređenju sa onima kod kojih nije dokazano prisustvo visokorizičnih CA.

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

Metodama deskriptivne statistike sagledana su obeležja od značaja za ispitanike sa dijagnozom multiplog mijeloma: starost u momentu postavljanja dijagnoze, klinički stadijum bolesti, tip paraproteina, prisustvo bubrežne slabosti. Rezultati su bili u skladu sa literaturnim (Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol 2014; 15: e538–e548).

U skladu sa postavljanim ciljevima rada metodom interfazne in situ hibridizacije (iFISH) kod bolesnika je utvrđivano prisustvo visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti (CA) del17p, t(4;14), t(14;16), kao i vrednost laktat dehidrogenaze u biohemijskim analizama i na osnovu toga bila je vršena distribucija bolesnika u odgovarajuće grupe rizika i praćen je odgovor na primenjenu terapiju i dužina preživljavanja.

Kod 14 (15,2%) bolesnika utvrđeno je prisustvo visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti: t(4;14), t(14;16), del 17p. Kod 18 (19,6%) bolesnika nađena je povišena vrednost LDH. Bolesnici sa visokorizičnim citogenetskim abnormalnostima su imali lošiji PFS (log-rank =

4.94,  $P= .026$  ) i ukupno preživljavanje (OS) ( $\log\text{-rank}=5.08$ ,  $P= .024$ ), u poređenju sa onima kod kojih nije dokazano prisustvo visokorizičnih CA.

Istom metodom (iFISH) utvrđivano je i prisustvo molekularno-genetičkih abnormalnosti hromozoma 1 kod naših ispitanika i ispitivan je njihov prognostički značaj.

Kod 27 (29,3%) bolesnika utvrđeno je prisustvo abnormalnosti hromozoma 1. Kod 8 (8,7%) bolesnika delecija 1p, a kod 19 (20,6%) dodatne kopije hromozoma 1q. Kod 4 (4,34%) bolesnika bila je prisutna hiperdiploidija +1q. U ovoj grupi bolesnika povoljan terapijski odgovor ( $\geq\text{PR}$ ) postignut je kod 51,9% bolesnika. Bolesnici sa abnormalnostima hromozoma 1 su se karakterisali kraćim trajanjem remisije na granici statističke značajnosti i jasno kraćim preživljavanjem u odnosu na bolesnike bez ovih abnormalnosti, što je u skladu sa podacima iz literature (Fonseca R, Van Wier SA, Chng WJ, Ketterling R, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia*. 2006;20(11):2034–40).

Analizirajući izolovano bolesnike sa del1p21, ova razlika u dužini remisije i ukupnom preživljavanju nije utvrđena, što se pre svega može objasniti malim brojem bolesnika – cele grupe. Abnormalnosti hromozoma 1 su od značaja za postizanje terapijskog odgovora, njegovo trajanje i ukupno preživljavanje.

„Real-time“ PCR metodom određivana je ekspresija CRBN, MDR i LRP kod naših ispitanika i praćen je njen značaj na tip terapijskog odgovora, dužinu trajanja remisije i ukupno preživljavanje.

Medijana ekspresije CRBN kod bolesnika sa MM je iznosila  $2,22 \pm 2,52$  (raspon 0,00-14,40), što je značajno više u odnosu na zdravu kontrolu (medijana 1,04,  $\pm 0,93$ ; raspon 0,3-2,90,  $P=0,013$ ). Korelacija između visoke ekspresije CRBN i povoljnog terapijskog odgovora bila je prisutna u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom, što je u skladu sa podacima iz literature, te visoka ekspresija CRBN može da posluži kao surogat marker za bolest niskog rizika, dok u grupi bolesnika koji su lečeni bortezomibom nije uočena, najverovatnije zbog malog broja bolesnika koji je lečen na ovaj način. Niska ekspresija CRBN može da

predstavlja prediktivni faktor za rezistenciju na imunomodulatorne lekove (Heintel D, Rocci A, Ludwig H, Bolomsky A, Caltagirone S, Schreder M, et al. High expression of cereblon (CRBN) is associated with improved clinical response in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone. Br J Haematol. 2013 Jun;161(5):695–700).

Analiza nivoa ekspresije RQ\_MDR1 pokazala je da je njena vrednost bila niža kod bolesnika koji su reagovali na lečenje  $252.1 \pm 46.2$  u odnosu na one koji su umrli  $493.8 \pm 168.$ , ali T testom nije postignuta statistička značajnost ( $p=0,233$ ). Slični rezultati su dobijeni i od RQ\_LRP  $181.9 \pm 31.5$  prema  $242.5 \pm 33.8$ , takodje bez postizanja statističke značajnosti ( $p=0,213$ ).

Prisutvo visokorizičnih abnormalnosti u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom nije bila povezana sa nižom ekspresijom CRBN. U grupi bolesnika koji su lečeni bortezomibom, nije utvrđen značaj ekspresije CRBN na PFS i OS.

Varijable koje su bile značajne u univarijantnoj analizi za PFS u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom, a to su ISS, LDH, CRBN, CA, uključene su u multivarijantnu analizu. Analiza je pokazala da su nivo ekspresije CRBN i vrednost LDH imale najveći prognostički značaj na PFS, što takođe odgovara literaturnim podacima.

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

1. Bila J, **Sretenovic A**, Jelacic J, Tosic N, Glumac I, Fekete MD, Antic D, Balint MT, Markovic O, Milojevic Z, Radojkovic M, Trajkovic G, Puric M, Pavlovic S, Mihaljevic B. **Prognostic Significance of Cereblon Expression in Patients With Multiple Myeloma.** Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2016 Nov;16(11):610-615.
2. Bila J, Jelacic J, Dencic Fekete M, Trajkovic G, **Sretenovic A**, Perunicic Jovanovic M, Antic D, Mihaljevic B. **The Revised International Staging System Compared to the Classical International Staging System Better Discriminates Risk Groups among Transplant-Ineligible Multiple Myeloma Patients.** Oncol Res Treat. 2017;40(10):616-620.

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

I pored svih napredaka u lečenju, multipli mijelom je i dalje neizlečiva bolest uz ograničeno prosečno preživljavanje obolelih. Pored jasno definisanih kliničkih i laboratorijski parametara koji su sastavni deo prognostičkih modela, savremene studije su usmerene na ispitivanje molekularno-genetičkih entiteta u okviru multiplog mijeloma.

Molekularna dijagnostika ima za cilj da se što ranije otkriju bolesnici sa agresivnom formom bolesti, za koje se vezuje loš ishod i pored primene savremenih terapijskih protokola. Uvođenjem ciljane terapije mogle bi se prevazići određene molekularno-genetičke abnormalnosti, što bi u krajnjem dovelo do poboljšanja terapijskog odgovora, toka i ishoda bolesti.

Utvrđivanje prognostičkog značaja molekularno-genetičkih abnormalnosti na tok i ishod multiplog mijeloma, omogućice definisanje mogućih mehanizama rezistencije u ovoj bolesti sa direktnim kliničkim uticajem na adekvatan terapijski pristup. Identifikacija bolesnika sa nepovoljnim prognostičkim profilom, uključujući i kliničke i molekularne činioce, omogućila bi u budućnosti individualni terapijski pristup.

Ovo istraživanje bi ukazalo na značaj uvođenja molekularnih prognostičkih faktora u nove prognostičke modele, u cilju rane detekcije visoko rizičnih bolesnika, izbora optimalne terapije i poboljšanja krajnjeg ishoda lečenja

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Aleksandre Sretenović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 28.06.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Biljana Mihaljević

---

Prof. dr Milena Todorović

---

Prof. dr Sonja Pavlović

---

Mentor:

Prof. dr Jelena Bila

---