

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu,održanoj dana 24.09.2015. godine, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„ Prediktivni zna aj PI3K/Akt signalnog puta i transportnih pumpi uklju enih u razvoj rezistencije na lekove kod bolesnika sa nemikrocelularnim karcinomom plu a“**

kandidata Prim dr Jelene Stojši , zaposlene u Službi za patohistologiju Klini kog centra Srbije, na Odeljenju za torakopulmonalnu patologiju. Mentor je dr Jasna Bankovi , dr sci, viši nau ni saradnik, Institut za biološka istraživanja “Siniša Stankovi ”, Univerzitet u Beogradu, a komentori su Prof. dr Ljiljana Markovi Deni i Prof. dr Vesna Škodri Trifunovi , Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Svetislav Tati , dr sci med, Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd
2. Doc. dr Anita Grgurevi , dr sci med, Institut za epidemiologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd
3. Doc dr Maja Ercegovac, dr sci med, Klinika za grudnu hirurgiju, Klini ki centar Srbije, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd
4. Nikola Tani , dr sci, nau ni savetnik, Institut za biološka istraživanja “Siniša Stankovi ”, Univerzitet u Beogradu, Beograd
5. Prof. dr Žaklina Mijovi , dr sci med, Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš

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

## IZVEŠTAJ

### A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija Prim dr Jelene Stojši napisana je na 79 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 25 slika i 18 tabela. Doktorska disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i izraze zahvalnosti.

U **uvodu** je izneta epidemiologija karcinoma pluća, njegova predominacija kod pacijenata muškog pola i broj u centralnoj Srbiji raste od 1985.god. do 2006.god., sa povećanjem procenta obolelih na godišnjem nivou od 2,31%. Navedeno je da je trend porasta stope mortaliteta od karcinoma pluća u oboje pola, kao i to da je kod pacijenata muške populacije mortalitet najveći između 60. i 69. godine života, a kod ženske populacije posle pedesete godine života. Izneti su i faktori rizika za nastanak karcinoma pluća, a kao glavni su navedeni duvanski dim i zagađenost vazduha.

Detaljno je opisana patohistologija karcinoma pluća, odnosno histološki tipovi, patohistološki stadijum tumorske bolesti pluća, histološki gradus, stepen nekroze, dezmozplastina reakcija i zapaljenska reakcija u i oko tumora. Navedeno je na in patohistološkog dijagnostikovanja nemikrocelularnog karcinoma pluća, preporučeni su protokoli za primenu hemoterapije ovih karcinoma posle postavljene patohistološke dijagnoze sa naglaskom na neoadjuvantnu hemoterapiju.

Izneti su značajni prednosti primene ciljane, personalizovane hemoterapije nemikrocelularnog karcinoma pluća u odnosu na hemoterapiju baziranu na bazi platine. U poslednje vreme se najviše ispituje epidermalni faktor rasta (EGFR) koji se nalazi na nishodnim signalnim putevima PI3/Akt/mTOR i Ras/Raf/MEK/ERK, dva najčešća izmenjena signalna puta kod nemikrocelularnih karcinoma pluća. Navedeno je da PI3/Akt/mTOR signalni put reguliše proliferaciju i apoptozu i da je ključan za nastanak i progresiju maligniteta, produžavajući život i stimulujući njihovu proliferaciju i inhibicijom apoptoze kao i da inaktivacija PTEN (engl. *phosphatase and*

*tensin homolog deleted on chromosome 10*), proteina izaziva aktivaciju PI3/Akt/mTOR signalnog puta i posledici povećava sintezu proteina, ubrzavaju i elijski ciklus, migraciju i preživljavanje ćelija. Gubitak funkcije PTEN-a povećava koncentraciju PIP-3 koji dovodi do prekomerne aktivacije Akt-a. Drugi značajan signalni put u kancerogenezi je Ras/Raf/MEK/ERK koji ubrzava proliferaciju ćelija, angiogenezu, njihovu diferencijaciju i migraciju. Ras i Raf geni dovode do aktivacije njihovih nishodnih ciljeva MEK1/2 i ERK1/2. Posebno su navedeni geni koji su uključeni u razvoj nemikrocelularnog karcinoma pluća: PI3K (engl. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*), PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), Akt (engl. *Protein Kinase B*) i ERK (engl. *Extracellular signal-Regulated Kinases*). Gubitak PI3K funkcije može usporiti tumorigenezu, a može kao inhibitor smanjiti broj EGFR mutiranih adenokarcinoma pluća. Detaljno je analizirana funkcija PTEN gena kod nemikrocelularnog karcinoma pluća i gubitak njegove heterozigotnosti. Prekomerna ekspresija PTEN proteina ukazuje na inhibiciju invazije nemikrocelularnog karcinoma pluća, a smanjena ekspresija povećava proliferaciju malignih ćelija, njihovo preživljavanje i smatra se lošim prognostičkim faktorom. Povećana ekspresija PTEN proteina udružena je sa ekspresijom EGRF-a i korelira sa boljom prognozom. pAkt igra važnu regulatornu ulogu u različitim elijskim procesima, navedeno je, naročito u progresiji karcinoma, posebno kod pušača. U literaturi je utvrđeno da EGFR-Akt-mTOR put aktivan i definisan u podtipovima nemikrocelularnih karcinoma pluća, a da mTOR može biti determinanta metastaza u limfnim čvorovima. Akt je prihvaćen kao predominantni medijator u signalima izazvanim mutacijom EGFR-a. pERK je kinaza koja ima značajnu ulogu u prenosu signala izazvanih različitim vrstama stimulacije koje dovode do proliferacije ćelija, apoptoze, diferencijacije, maligne transformacije, angiogenezu, smrti ćelije i rezistencije na lekove.

Posebno je analizirana rezistencija nemikrocelularnog karcinoma pluća na primenjenu hemoterapiju. Navedena je klasifikacija odnosno tipovi rezistencije i njihov odnos sa signalnim putevima u malignim ćelijama nemikrocelularnog karcinoma pluća. Analizirani su transportni proteini odnosno familija transportnih pumpi koje su odgovorne za izbacivanje hemoterapeutika iz malignih ćelija i nastanka rezistencije na primenjene lekove. U analizu su uključeni P-glikoprotein (P-gp, ABCB1), *multidrug resistance-*

*associated protein 1* (MRP1, ABCC1) i *breast cancer resistance protein* (BCRP, ABCG2). Prekomerna ekspresija P-glikoproteina (P-gp, ABCB1) se u ova umalignim elijama izloženim terapijaidoksorubicinom, paksitakselom ili gemcitabinom. Konstatovano je da je *multidrug resistance-associated protein 1* (MRP1; ABCC1) prekomerno eksprimiran u malignim elijama i pre primene hemoterapije. Navedeno je da je ovaj protein prekomerno eksprimiran kod dobro diferentovanih nemikrocelularnih karcinoma pluća, naročito skvamocelularnog tipa. Međutim, postoje i rezultati koji pokazuju da je povećan intenzitet ekspresije MRP1 utvrđen kod adenokarcinoma pluća, dok kod skvamocelularnog i krupno elijskog karcinoma pluća nijeekspimiran.Povećana BCRP ekspresija u elijama nemikrocelularnog karcinoma pluća je loš prognostički znak, pošto ovaj protein ima afinitet za vezivanje i izbacivanje iz elije hemoterapeutika na bazi platine

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Oni podrazumevaju analizuPTEN, pAkt, pERKekspresije na nivou proteina i LOH PTEN gena, kao i analizu P-gp, MRP1 i BCRP na iRNA i proteinskom nivou. U odnosu na dobijene promene analiziranih gena i proteina. Ispitivana je korelacija dobijenih promena međusobno i u odnosu sa kliničkim parametrima ispitivanih pacijenata. Posebno je sagledavana dužina preživljavanja ispitivanih pacijenata u odnosu nadobijene promene analiziranih gena i proteina.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je u ovom istraživanju korišćena studijapo tipu prekinute vremenske serije (engl. *interrupted time series*). Ispitivane su dve grupe pacijenata. Svaku grupu je činilo po 35 pacijenata. Prvu grupu su činili pacijenti sa nemikrocelularnim karcinomom pluća koji su leženi hemoterapeuticima baziranim na platini, pa posle primenjene terapije operisani. Drugu grupu su činili pacijenti koji nisu primali hemoterapiju pre operacijedijagnostikovanog nemikrocelularnog karcinoma pluća. Svi pacijenti su operisani na Klinici za grudnu hirurgiju Kliničkog centra Srbije, a patohistološka dijagnoza je postavljena na Odeljenju torakopulmonalne patologije Službe za patohistologiju Kliničkog centra Srbije. Hemoterapija je aplikovana u Dnevnoj bolnici Klinike za pulmologiju Kliničkog centra Srbije. Podaci o preživljavanju ispitivanih pacijenata su dobijene iz mortalitetne baze Instituta za javno zdravlje “Milan Jovanović - Batut”, iz istorija bolesti ili telefonskim pozivima ispitivanih pacijenata ili njihovih porodica.

Izolacija nukleinskih kiselina, njihova analiza i imunohistochemijska bojenja sa uzoraka parafinskih kalupa na kojima je postavljena dijagnoza nemikrocelularnog karcinoma pluća ispitivanih pacijenata su vršena u Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu. Detaljno je izneta procedura izolacije nukleinskih kiselina, njihovih analiza i imunohistochemijskih bojenja kao i metode evaluacije ekspresije ispitivanih proteina. Na kraju poglavlja su navedene primenjene statističke metode i statistički program.

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 114 referenci.

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

Ovo istraživanje je pokazalo da su prisustvo LOH *PTEN* gena i nivo pAkt i pERK ekspresije bili slični u obe grupe pacijenata, i one koja je primala i one koja nije primala neoadjuvantnu hemoterapiju. *PTEN* ekspresija je bila lako povišena u grupi pacijenata koja nije primala neoadjuvantnu hemoterapiju. Dalja istraživanja su uključila ispitivanja prisustva korelacije LOH *PTEN* gena i pAkt, pERK i *PTEN* ekspresije i klinički patoloških parametara ispitanika koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju i onih koji je nisu primali. Dobijeni rezultati su pokazali da je u grupi pacijenata koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju i kod kojih nisu dijagnostikovane metastaze u limfnim nodusima broj onih sa sniženom pAkt ekspresijom bio statistički značajno veći nego broj onih sa visokom pAkt ekspresijom. Moglo bi se reći da neoadjuvantna hemoterapija snižava ekspresiju ovog proteina sugerirajući njegovu korisnu ulogu kod karcinoma kod kojih je aktiviran PI3K/Akt/mTOR signalni put i kod kojih nisu zahvaćeni limfni nodusi, što se obično odražava u ranijim stadijumima tumorske bolesti. Ispitivanjem odnosa preživljavanja i statusa *PTEN*, pAkt i pERK ekspresije i LOH *PTEN* gena, uočeno je da su pacijenti koji

su bili u grupi koja je primala neoadjuvantnu hemoterapiju i imala snižen nivo pERK ekspresije živeli značajno duže od onih sa povišenom pERK ekspresijom.

Najinteresantniji rezultati su dobijeni kada su uzorci sa nemikrocelularnim karcinomom pluća bili grupisani prema histološkom tipu. Ispitanici sa skvamocelularnim karcinomom pluća i ekspresijom *LOHPTEN* gena i koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju su živeli značajno duže od onih koji je nisu primali. Ispitanici sa adenokarcinomom pluća koji su imali nisku pERK ekspresiju i primili neoadjuvantnu hemoterapiju su imali najduže preživljavanje, zatim ispitanici sa niskom pERK ekspresijom bez neoadjuvantne hemoterapije, a zatim ispitanici sa visokom pERK ekspresijom i bez neoadjuvantne terapije. Ovakvi rezultati su vrlo značajni jer ukazuju na mogućnost grupisanja pacijenata prema histološkom tipu nemikrocelularnog karcinoma pluća pre primene personalizovane terapije.

Pacijenti sa smanjenom P-gp ekspresijom koji nisu primili neoadjuvantnu hemoterapiju živeli su značajno duže od onih koji su tu terapiju primili. Istovetan trend je uočen i kod pacijenata obolelih od skvamocelularnog karcinoma pluća. Pacijenti kod kojih je dijagnostikovana ovaj histološki tip karcinoma pluća i koji nisu primali neoadjuvantnu hemoterapiju i sa smanjenom P-gp ekspresijom živeli su značajno duže od onih koji ovu terapiju primili. Utvrđeno je najviše ekspresija MRP1 na nivou gena i ubedljivo visoka ekspresija na nivou proteina. Konstatovana je značajna MRP1 ekspresija kod velikog broja pacijenata koji nisu primili neoadjuvantnu hemoterapiju. Ovakav rezultat ukazuje na potrebu za testiranjem pacijenata na prisustvo ove transportne pumpe u karcinomu pre primene hemoterapije obzirom da se nesitno elijski karcinom pluća kod većine pacijenata tretira hemoterapeutima na bazi platine koje maligne ćelije prvenstveno izbacuju upravo MRP1 transportnom pumpom. Utvrđeno je značajna povezanost između BCRP ekspresije i loše prognoze i terapijskog odgovora na primenjenu hemoterapiju na bazi platine kod uznapredovalog nemikrocelularnog karcinoma pluća. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da kod pacijenata koji nisu primili neoadjuvantnu hemoterapiju i kod kojih nisu postojale metastaze u limfnim čvorovima postoji značajno visoka BCRP ekspresija. Ekspresija BCRP na novou RNK i na proteinskom nivou u obe ispitivane grupe je bila ujednačena. Nije utvrđeno povezanost BCRP i MRP1 ekspresije sa histološkim tipom karcinoma pluća,

starosti, polom i opštim stanjem pacijenata obolelih od nemikrocelularnog karcinoma pluća. Jedino je utvrđeno da nivo BCRP ekspresije korelira pozitivno sa nivoom MRP1 ekspresije dovodeći do zaključka da je samo MRP1 prediktor za odgovor na hemoterapiju baziranu na derivatima platine.

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

PTEN ekspresija je ispitivana uglavnom na karcinomima dojke (Yonemura i saradnici, 2009.; Barbereschi i saradnici, 2012.g.) i rektuma (Erben i saradnici, 2011.) koji su tretirani neoadjuvantnom hemoterapijom i gde se kao i u našem istraživanju došlo do zaključka da ne postoji korelacija u nivou njegove ekspresije sa primenjenom hemoterapijom. Broj pacijenata sa sniženom pAkt ekspresijom u grupi pacijenata koji su primili neoadjuvantnu hemoterapiju i kod kojih nisu dijagnostikovane metastaze u regionalne limfne noduse je bio statistički značajno veći od onih sa povišenom pAkt ekspresijom što odgovara radovima (Al-Saad i saradnici, 2009.; David i saradnici, 2014.) koji su konstatovali da se u ranim stadijumima tumorske bolesti detektuje pAkt ekspresija. Pošto je pokazano da neoadjuvantna hemoterapija ima pozitivan efekat kod ispitanika sa aktiviranim PI3K/Akt/mTOR signalnim putem, povišen pAkt nivo bi mogao postati pozitivan prediktor za primenu hemoterapije bazirane na derivatima platine kod nemikrocelularnih karcinoma pluća, jer je dokazano da je antitumorska aktivnost sprovedena kroz Akt i ERK1/ERK2 signalne puteve (Zhang, 2011.; Zhang 2014.). Ovo istraživanje je u saglasnosti sa drugim sličnim istraživanjima (Miao i saradnici, 2014.; Weyergang i saradnici, 2013.) koji su utvrdili da snižen nivo pERK ekspresije može biti važan faktor za produženo preživljavanje pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju, bez obzira na histološki tip nemikrocelularnog karcinoma pluća.

Povećana ekspresija P-gp je dovedena u vezu sa krajim preživljavanjem pacijenata (Zhu i saradnici, 2012), što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja u kome je ustanovljeno da su pacijenti koji nisu primili neoadjuvantnu hemoterapiju sa smanjenom P-gp ekspresijom živeli značajno duže od onih koji su tu terapiju primili. MRP1 i P-gp su

naj eš e eksprimirane transportne pumpe u nemikrocelularnim karcinomima pluća (Roy i saradnici, 2007.), što je u skladu sa ispitivanjima u ovoj studiji gde je utvrđena značajno visoka ekspresija i na nivou mRNA i proteina. Prekomerna ekspresija MRP1 u ćelijama nemikrocelularnog karcinoma pluća još pre primenjene hemoterapije je visoko značajan indikator za lošu prognozu kod odgovora karcinoma na primenjenu hemoterapiju i lošije preživljavanje pacijenata (Munoz i saradnici, 2007.; Filipits i saradnici, 2007.). Rezultati ovog ispitivanja ukazuju da je MRP1 ekspresija bila visoka i kod pacijenata sa I ili II stadijumom tumorske bolesti koji nisu primili neoadjuvantnu hemoterapiju. Međutim, histološki tip karcinoma ima uticaj na nivo ekspresije MRP1 bez obzira na starost, pol, stadijum tumorske bolesti i prisustvo metastaza (Wright i saradnici, 1998.). U istom radu je zaključeno da ćelije adenokarcinoma i hiperplastičnih pneumocita slabije eksprimiraju MRP1 od ćelija skvamocelularnog karcinoma pluća i krupnog ćelijskog karcinoma pluća. Postoji značajna povezanost između BCRP ekspresije i loše prognoze i terapijskog odgovora na primenjenu terapiju baziranu na derivatima platine kod uznapredovalog nemikrocelularnog karcinoma pluća (Yoh i saradnici, 2004.), što je istovetno rezultatu iznetom u ovoj doktorskoj disertaciji. Postoji ujednaćena ekspresija BCRP na nivou mRNA i ekspresije proteina (Li i saradnici, 2010.g.) što je ustanovljeno i u ovoj disertaciji. Ustanovljeno je u istom radu i da ne postoji korelacija između nivoa ekspresije ovog proteina sa polom, starosti, opštim stanjem pacijenata, histološkim tipom nemikrocelularnog karcinoma.

#### **D) Objavljeni rad koji čini deo doktorske disertacije**

**Jelena Stojšić**, Tijana Stanković, Sonja Stojković, Vedrana Milinković, Jelena Dinic, Zorica Milosević, Zorka Milovanović, Nikola Tanic, Jasna Banković. Prolonged survival after neoadjuvant chemotherapy related with specific molecular alterations in the patients with nonsmall-cell lung carcinoma. Rad je obavljen u časopisu: *Experimental and Molecular Pathology* 2015; 98: 27–32; 20. 11. 2014. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.11.010.



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

Literaturni podaci o povezanosti Ras/Raf/MEK/ERK i PI3K/Akt/mTOR signalnih puteva i transportnih pumpi uključeni u rezistenciju na hemioterapiju nemikrocelularnog karcinoma pluća su oskudni. Doktorska disertacija pod nazivom, „**Prediktivni značaj PI3K/Akt signalnog puta i transportnih pumpi uključeni u razvoj rezistencije na lekove kod bolesnika sa nemikrocelularnim karcinomom pluća**“ doprinela je rasvetljavanju ove veze, a ispitivani geni i eksprimirani proteini bi mogli biti važni prognostički faktori za razvitak i širenje nemikrocelularnog karcinoma pluća. Pored toga, rezultati ove doktorske disertacije bi mogli poslužiti u personalizovanoj terapiji nemikrocelularnog karcinoma pluća.

Ovo ispitivanje je urađeno 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 vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Prim. dr. Jelene Stojšić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

lanovi Komisije:

Prof. dr Svetislav Tati

---

Doc. dr Anita Grgurevi

---

Doc. Dr Maja Ercegovac

---

Nikola Tani , dr sci, nau ni savetnik

---

Prof. dr Źaklina Mijovi

---

Mentor:

dr Jasna Bankovi , dr sci,  
viši nau ni saradnik

---

Komentori:

Prof. dr Ljiljana Markovi Deni

---

Prof dr Vesna Źkodri Trifunovi

---