

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 15.03.2018. godine, broj 5940/15, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**“POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA GLUTATION PEROKSIDAZU I
SUPEROKSID DISMUTAZU SA NASTANKOM I PROGRESIJOM KARCINOMA
PRELAZNOG EPITELA MOKRAĆNE BEŠIKE”**

kandidata dr Predraga Nikića, zaposlenog u Klinici za urologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentor je Prof. dr Dejan Dragičević. Komentor je Doc. dr Marija Matić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Zoran Džamić, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Marija Plješa Ercegovac, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Goran Marušić, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

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 Predraga Nikića napisana je na ukupno 89 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 15 tabela, 8 grafikona i dve slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **Uvodu** je definisano šta je karcinom mokraćne bešike, dat je detaljan pregled epidemioloških podataka, u potpunosti je opisan savremeni pristup u postavljanju

dijagnoze i prikazana je precizna klasifikacija bazirana na kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma mokraćne bešike. Pregledno i detaljno su navedeni do sada poznati faktori rizika u nastanku karcinoma mokraćne bešike, sa posebnim osvrtom na pušenje i izloženost profesionalnim hemijskim karcinogenima kao najznačajnijim. Na adekvatan način opisani su metabolizam karcinogena i uloga oksidativnog stresa u karcinogenezi, sa detaljnim osvrtom na dosadašnja saznanja vezana za značaj polimorfnih genetskih varijanti antioksidativnih enzima glutation peroksidaze (*GPX*) i superoksid dismutaze (*SOD*) u nastanku i progresiji različitih tipova karcinoma. U potpunosti su opisane indikacije i izbor terapijskog modaliteta prema stadijumu bolesti. Hirurgija kao glavni vid lečenja urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike detaljno je opisana, kao i mesto sistemske hemioterapije u terapijskom algoritmu. U uvodu je jasno istaknuto da još uvek ne postoje precizni prognostički i prediktivni molekularni markeri kod karcinoma mokraćne bešike.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja povezanosti polimorfizma gena za *GPX1* i *SOD2* sa rizikom za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, nezavisno i udruženo sa faktorima spoljne sredine, kao što su pušenje i profesionalna izloženost hemijskim karcinogenima. Dalje, ispitivana je povezanost polimorfizma gena za *GPX1* i *SOD2* sa fenotipskim karakteristikama kao što su stadijum bolesti i patohistološki gradus urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Pored toga, cilj rada bio je i procena prognostičkog značaja genskog polimorfizma *GPX1* i *SOD2* kod bolesnika sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su lečeni sistemskom hemioterapijom na bazi cisplatina.

U poglavlju **Materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji slučajeva i kontrola koja je sprovedena u Klinici za urologiju Kliničkog centra Srbije i u Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ispitivanu grupu činilo je ukupno 330 pacijenata (230 muškaraca i 100 žena) prosečne starosti $65 \pm 10,3$ godina sa patohistološki potvrđenom dijagnozom urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike koji su lečeni u Klinici za urologiju Kliničkog Centra Srbije u Beogradu u periodu od 2011 do 2015. Kontrolna grupa bila je sačinjena je ukupno 227 ispitanika uparenih po uzrastu ± 2 godine ($63,4 \pm 7,9$ godina) i polu (154 muškaraca i 73 žene), koji su u istom vremenskom periodu lečeni u istoj ustanovi zbog urolitijaze, bez verifikovanog malignog oboljenja. Jasno su definisani kriterijumi za uključenje u studiju,

kao i kriterijumi za isključenje iz studije. Detaljno je opisan način prikupljanja demografskih, kao i podataka o izloženosti faktorima spoljne sredine, kao što su pušenje i profesionalna izloženost hemijskim karcinogenima. Precizno je naveden postupak uzimanja i čuvanja uzoraka krvi, kao i način obrade primenjenim molekularno genetskim testovima. Polimorfizam *GPX1 (rs1050450)* gena je određen analizom proizvoda restrikcione digestije DNK fragmenata nastalih reakcijom lančanog umnožavanja (*engl. Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism, (PCR - RFLP)*). Polimorfizam *SOD2 (rs4880)* gena određen je kvantitativnom PCR metodom (*engl. quantitative PCR, (qPCR)*). Ukupno preživljavanje pacijenta sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne besike koji su primali hemioterapiju na bazi cisplatina praćeno je u periodu od dve godine. Precizno su navedeni hemioterapijski protokoli primenjeni u lečenju, i način na koji su pacijenti praćeni. Ova studija je sprovedena u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji i odobrena je od strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Sve osobe od kojih je uziman biološki materijal koji je korišćen u studiji, kao i njihovi lični podaci, su dale pisani pristanak pre uključenja u studiju.

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

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. Svi rezultati su pažljivo interpretirani, uz prepoznavanje ograničenja studije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **Literatura** sadrži spisak od 152 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati doktorske teze dr Predraga Nikića su pokazali da pušenje i profesionalna izloženost hemijskim karcinogenima predstavljaju nezavisne faktore rizika u nastanku urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Naime, pacijenti pušači imali su 4 puta veći rizik da obole od urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, u poređenju sa nepušačima. Kod osoba profesionalno izloženih hemijskim karcinogenima

rizik u nastanku urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike je 2 puta bio veći u poređenju sa neizložanim osobama.

Takođe, pokazano je da genetski polimorfizam antioksidativnog enzima *SOD2* modulira rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike nezavisno i u sadejstvu sa faktorima spoljnje sredine. Naime, pacijenti nosioci jednog ili oba varijantna *Val-SOD2* alela imali su oko 1,5 puta veći rizik da dobiju urotelijalni karcinom mokraćne bešike u poređenju sa osobama koje su imale referentni *SOD2 Ala16Ala* genotip. Udruženo sa pušenjem, rizik da dobiju urotelijalni karcinom mokraćne bešike se povećao na 7,5 puta kod pušača nosioca jednog ili oba varijantna *Val-SOD2* alela u poređenju sa nepušačima nosiocima referentnog *SOD2 Ala16Ala* genotipa. Premda je u grupi pacijenata postojalo više nosioca varijantnog *Leu-GPX1* alela (67%) u poređenju sa kontrolnom grupom (61,5%), ova razlika nije bila statistički značajna. Takođe, nije uočeno postojanje značajne udruženosti pušenja sa *GPX1* genotipom u modulaciji rizika za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike.

Dalje, rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj tezi su pokazali da genetski polimorfizam *GPX1* značajno utiče na fenotipske karakteristike urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Naime, stratifikacija pacijenata prema stadijumu bolesti i gradusu tumora, pokazala je značajno češću udruženost *GPX1 Pro200Leu* i *GPX1 Leu200Leu* genotipova sa nižim stadijumom bolesti i nižim gradusom tumora, što je ukazivalo da prisustvo varijantnog *Leu-GPX1* alela je povezano sa manjom invazivnošću i nižim stepenom maligniteta urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Nije uočeno postojanje značajne udruženosti polimorfizma *SOD2* sa stadijumom bolesti i gradusom tumora.

Kod pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su lečeni hemioterapijom na bazi cisplatina, nije uočeno postojanje značajnog uticaja *GPX1* i *SOD2* genetskog polimorfizma na ukupno preživljavanje.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U nedostatku preciznih prognostičkih i prediktivnih molekularnih markera, opravdano je mišljenje da prisustvo genetskih varijanti antioksidativnih enzima *GPX1* i *SOD2*, koje funkcionalno za posledicu imaju izmenjenu enzimsku aktivnost, bi moglo da utiče na rizik za nastanak, progresiju i efikasnost terapije urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Dosadašnja istraživanja polimorfizama *GPX1 rs1050450* gena i *SOD2 rs4880* gena kod pacijenata sa karcinomima različitih lokalizacija pokazala su

kontradiktorne rezultate saopštene u literaturi. U studijama sprovedenim kod pacijenata sa hormonski zavisnim karcinomima poput karcinoma dojke, ovarijuma i prostate, uočeno je postojanje povećanog rizika za nastanak karcinoma kod osoba koje su imale *Ala-SOD2* alel (Kang SW, 2015; Kang D i sar, 2007). Suprotno tome, kod karcinoma mokraćne bešike, pluća, kolorektalnog i skvamocelularnog karcinoma usne duplje povećan rizik je registrovan kod osoba nosioca varijantnog *Val-SOD2* alela (Hung RJ i sar, 2004; Kang D i sar, 2007; Liu Y i sar, 2014). Rezultati ove doktorske teze su pokazali da osobe nosioci jednog ili oba varijantna *Val-SOD2* alela imaju 1,5 puta veći rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, što je u skladu sa nalazima Hung-a i sar, koji su pokazali da prisustvo *Val-SOD2* alela povećava 1,9 puta rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike u populaciji ispitanika iz severne Italije (Hung RJ i sar, 2004). Međutim, poslednjih godina, povezanost *GPX1* i *SOD2* polimorfizma i karcinoma mokraćne bešike ispitivana je u nekoliko studija sa rezultatima koji se razlikuju od dobijenih u ovom istraživanju. Naime, istraživačke grupe iz Turske (Kucukgergin C i sar, 2012), Japana (Ichimura Y i sar, 2004) i Ekvadora (Paz-y-Miño C i sar, 2010) su pokazale da značajno povišen rizik u nastanku karcinoma mokraćne bešike postoji kod osoba nosioca varijantnog *Leu-GPX1* alela, ali ne i kod osoba sa polimorfnim varijantama *SOD2*. Razlike uočene poređenjem sa rezultatima ove doktorske disertacije, mogu se objasniti postojanjem značajne heterogenosti u geografskoj distribuciji *GPX1* genotipova. Naime, poznato je da se *Leu-GPX1* alel detektuje kod 36% belaca, 33% crnaca, 5% Japanaca i do sada nije otkriven kod Kineza, što može da bude značajno u tumačenju rezultata studija različitih etničkih populacija (Habyarimana T i sar, 2018). Premda se svi slažu da postoje, trenutno u literaturi nema podataka u vezi sa geografskim razlikama u distribuciji učestalosti *Val-SOD2* alela.

Pušenje je jedan od najvažnijih faktora rizika za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Rezultati ove doktorske teze su pokazali da pušači imaju 4 puta veći rizik da obole od urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, što je u skladu sa rezultatima drugih istraživača koji su pokazali postojanje 2-4 puta većeg rizika kod pušača (Rink M i sar, 2015; Frits HM van Osch i sar, 2016; Freedman ND i sar, 2011). Takođe, u ovom radu je pokazano postojanje 2 puta većeg rizika za nastanak karcinoma mokraćne bešike kod osoba koje su bile profesionalno izložene hemijskim karcinogenima, što je u skladu sa rezultatima drugih autora (Kiriluk KJ i sar, 2012; Cumberbatch MGK i sar, 2015).

Obzirom da je pušenje značajan izvor slobodnih radikala, od interesa je bilo ispitati udruženi efekat pušenja i polimorfni varijanti *GPX1* i *SOD2*. Rezultati ove doktorske teze su pokazali da osobe pušači nosioci barem jednog varijantnog *Val-SOD2* alela (*SOD2 Val16Ala + Val16Val* genotip) imaju 7,5 puta veći rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Do sada samo jedna istraživačka grupa ispitala je uticaj polimorfizma gena *SOD2* sa rizikom za nastanak karcinoma mokraćne bešike kod pušača (Hung RJ i sar, 2004). Njihovi rezultati su pokazali značajno povećanje rizika na oko 7 puta kod osoba nosioca varijantnog *Val-SOD2* alela udruženo sa pušenjem, što je u skladu sa rezultatima ove doktorske teze. Slični rezultati su dobijeni i u prethodno objavljenim studijama kod pacijenata sa karcinomima drugih lokalizacija. Aynali i sar, su pokazali postojanje povećanog rizika u nastanku karcinoma larinksa u populaciji pušača koji su imali *SOD2 Val16Val* genotip, ali ne i kod pušača sa polimorfni varijantama *GPX1* (Aynali G i sar, 2013). Postojanje značajno većeg rizika kod pušača nosioca jednog ili oba varijantna *Val-SOD2* alela potvrđeno je i u studiji kod pacijenata sa skvamocelularnim karcinomom usne duplje (Liu Y i sar, 2014). Rezultati ove doktorske teze u skladu su sa dokazima o postojanju dvojake uloge *SOD2* u nastanku i razvoju karcinoma (Kim YS i sar, 2017; Hempel N i sar, 2011).

Postojanje značajne povezanosti genetskog polimorfizma *GPX1* sa stadijumom bolesti i patohistološkim gradusom tumora uočena je u ovom doktorskom radu, a po prvi put u literaturi, ispitivana je povezanost genetskog polimorfizma *SOD2* sa fenotipskim karakteristikama urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Naime, kod osoba sa varijantnim *GPX1 Pro198Leu* i *GPX1 Leu198Leu* genotipovima češće je detektovan urotelijalni karcinom mokraćne bešike nižeg stadijuma i nižeg gradusa u poređenju sa referentnim *GPX1 Pro198Pro* genotipom. Istovremeno, nije pokazano da postoji značajna povezanost genetskog polimorfizma *SOD2* sa stadijumom bolesti i gradusom tumora. Samo dva istraživanja su do sada sprovedena kod pacijenata sa karcinomom mokraćne bešike u cilju ispitivanja povezanosti genetskog polimorfizma *GPX1* sa stadijumom bolesti i patohistološkim gradusom tumora, a rezultati odstupaju od onih dobijenih u ovom doktorskom radu. Naime, etnička studija sprovedena na Marokanskoj populaciji (Hadami K i sar, 2016) pokazala je da polimorfizam *GPX1Pro198Leu* nije bio povezan niti sa stadijumom bolesti, niti sa gradusom tumora. Nasuprot tome, studija sprovedena u Turskoj, pokazala je da *GPX1 Leu/Leu* genotip je značajno češće bio udružen sa višim stadijumom bolesti (Kucukgergin C i sar, 2012).

Međutim, rezultati ove doktorske teze su saglasni sa rezultatima dobijenim u istraživanju sprovedenom kod pacijentkinja sa karcinomom dojke, koji su pokazali postojanje protektivnog efekta *Leu-GPX1* alela, odnosno povezanost *Leu-GPX1* alela sa nižim stadijumom bolesti i nižim gradusom tumora (Habyarimana T i sar, 2018). Tumačenje rezultata dobijenih u ovom doktorskom radu je u skladu sa dokazima o protumorogenom delovanju *GPX1* u procesima diferencijacije, proliferacije i angiogeneze (Sullivan LB i Chandel NS, 2014).

Po prvi put u literaturi, u ovoj doktorskoj tezi sprovedeno je istraživanje efekta genskog polimorfizma *GPX1* (*rs1050450*) i *SOD2* (*rs4880*) kod pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju. Dobijeni rezultati nisu pokazali da postoji značajan uticaj genskog polimorfizma *GPX1* i *SOD2* na ukupno preživljavane kod ovih pacijenata. Međutim, rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj tezi su slični sa rezultatima prethodno publikovanih studija sprovedenih kod pacijenata sa karcinomima drugih lokalizacija lečenih hemioterapijom. Naime, istraživačka grupa iz Danske pokazala je da *SOD2* genotip nije bio povezan sa rekurencijom karcinoma dojke kod pacijentkinja koje su primale adjuvantnu ciklofosamid baziranu hemioterapiju (Cronin-Fenton DP i sar, 2014). Slične rezultate su dobili Geng i sar, koji su istovremeno ispitali genetski polimorfizam za devet različitih antioksidativnih enzima kod pacijenata sa metastatskim karcinomom želuca koji su primali hemioterapiju. Njihovi rezultati su pokazali da genetski polimorfizam *SOD2* nema prognostički značaj u proceni nastanka progresije bolesti, niti u proceni ukupnog preživljavanja (Geng R i sar, 2014). Sa druge strane, Yao i sar, su u svom istraživanju pokazali da postojanje *Ala-SOD2* alela u genotipu, koje funkcionalno za posledicu ima povećanu enzimsku aktivnost *SOD2*, je bilo udruženo sa manjom učestalošću pojave neželjenih efekata u toku terapije, ali istovremeno i sa bržom progresijom bolesti posle primenjene adjuvantne hemioterapije kod pacijentkinja sa karcinomom dojke (Yao S i sar, 2010). Pregledom literature, postoji samo mali broj studija u kojima je ispitan prognostički značaj genskog polimorfizma *GPX1* kod pacijenata koji su primali hemioterapiju. U istraživanju sprovedenom kod pacijenata sa skvamocelularnim karcinomom glave i vrata koji su lečeni hemio-radioterapijom, nije pokazano da postoji značajan uticaj genskog polimorfizma *GPX1* na terapijski odgovor, niti na ukupno preživljavanje (Dequanter D i sar, 2017).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. *Predrag Nikic, Dejan Dragicevic, Ana Savic-Radojevic, Marija Pljesa-Ercegovac, Vesna Coric, Djurdja Jovanovic, Uros Bumbasirevic, Tatjana Pekmezovic, Tatjana Simic, Zoran Dzamic, Marija Matic. Association between GPX1 and SOD2 genetic polymorphisms and overall survival in patients with metastatic urothelial bladder cancer: a single-center study in Serbia . J BUON 2018, Vol.23: No 3-4*

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija "POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA GLUTATION PEROKSIDAZU I SUPEROKSID DISMUTAZU SA NASTANKOM I PROGRESIJOM KARCINOMA PRELAZNOG EPITELA MOKRAĆNE BEŠIKE" dr Predraga Nikića kao prvi ovakav rad u našoj populaciji, predstavlja originalni naučni doprinos u istraživanjima koja se odnose na procenu uloge genetskog polimorfizma antioksidativnih enzima u nastanku i progresiji urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Pored potvrde da pušenje i profesionalna izloženost hemijskim karcinogenima predstavljaju nezavisne faktore rizika u nastanku urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, ovim istraživanjem je pokazano da genetski polimorfizam antioksidativnog enzima *SOD2* značajno modulira rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike nezavisno i u sadejstvu sa faktorima spoljnje sredine. Takođe, ovaj doktorski rad pokazuje da je genetski polimorfizam enzima *GPX1* značajno povezan sa fenotipskim karakteristikama urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, odnosno stadijumom bolesti i patohistološkim gradusom tumora. Trenutno, u nedostatku preciznih prognostičkih i prediktivnih molekularnih markera kod urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, rezultati dobijeni ovom studijom mogu poslužiti u planiranju daljih longitudinalnih istraživanja o značaju genetskog polimorfizma antioksidativnih enzima kod ovih pacijenata.

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 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 Predraga Nikića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 13.04.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Zoran Džamić, predsednik

Prof. dr Marija Plješa Ercegovac

Prof. dr Goran Marušić

Mentor:

Prof. dr Dejan Dragičević

Komentor:

Doc. dr Marija Matić
