

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 31.01.2014. godine, broj 4600/7, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„PROMENE AKTIVNOSTI ENZIMA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U KRVI I
TKIVU KOD BOLESNIKA SA GLIOBLASTOMOM I MENINGEOMOM“**

kandidata mr dr Vojislava Bogosavljevi a, zaposlenog u Klini kom Centru Srbije u Beogradu na klinici za neurohirurgiju u zvanju klini kog asistenta (ugovor u delu sa Medicinskim fakultetom u Beogradu). Mentor je Prof. dr Miodrag Raki , komentor je Prof. dr Milica Baj eti .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Vaso Antunovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Miloš Jokovi , docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. VNS dr Aleksandra Nikoli Koki , IBISS

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci Vojislava Bogosavljevi napisana je na 99 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, pregled literature, cilj istraživanja, materijal i metode,

rezultati, diskusija, zaključak i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 37 slika i 20 tabela.. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena imena korištenih u tekstu.

U **uvodu** je definisano da nivo oksidacije koji prevazilazi fiziološke granice se označava kao oksidativni stres. Dugo se smatralo da ROS (tkz. Reactive Oxygen Species - ROS) isključivo imaju negativne biološke efekte, odnosno da predstavljaju neku vrstu "neizbežnog zla", u poslednjoj dekadi je prikupljen veliki broj dokaza i o njihovoj pozitivnoj ulozi u raznim signalnim putevima. Sveukupno gledajući, ROS i redoks procesi učestvuju u nizu (patofizioloških) procesa, kao što su :

- elijska proliferacija i diferencijacija, prenos signala, regulacija metabolizma i komunikacija
- citoprotektivni mehanizmi (inflamacija, odbrana od mikroorganizama)
- patofiziološki fenomeni (starenje, apoptoza, nekroza, kancerogenoza i dr.)

U **pregledu literature** su predstavljena dosadašnja dostignuća gde je ukupni redoks status opšte prihvaćen kao glavni faktor u regulaciji kako normalne, tako i maligne elije. Pomeranje redoks ravnoteže ka oksidaciji može značajno povećati proliferativni kapacitet malignih elija. elijsko redoks stanje ima značajan uticaj na kontrolu preživljavanja, apoptoze i ekspresiju tumor supresornih gena. Oksidaciono stanje u eliji pogoduje nastanku tumora, dok redukovano redoks okruženje pogoduje nastanku apoptoze. Poremećaj u redoks ravnoteži elije dovodi do oksidativnog stresa, što je zapaženo kod različitih tipova kancera. Smatra se da reaktivne forme imaju ključnu ulogu u razvoju karcinoma kod ljudi. Dobro je poznato da oksidativni stres može da konvertuje normalne elije u elije sa kancerskim fenotipom. Funkcija AOS je izmenjena u različitim tipovima kancera. AOS se sastoji od enzima superoksid dismutase (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSH-Px) i glutation reduktaze (GR), dok je najvažnija ne-enzimska komponenta sam glutaiion (GSH). Tumorsko tkivo indukuje oksidativni pritisak na krv, što se može videti kroz izmenjeni AOS profil onkoloških pacijenata.

Ciljevi rada su precizno definisani. Ovo istraživanje je imalo cilj da utvrdi promene u aktivnostima enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima i plazmi :

- a. pacijenata sa glioblastomom u odnosu na zdrave ispitanike
- b. pacijenata sa meningeomom u odnosu na zdrave ispitanike

Da se utvrde promene u aktivnostima enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima i plazmi pacijenta sa glioblastomom u odnosu na pacijente sa meningeomom.

Da se utvrde promene u enzimima antioksidativne zaštite u tkivu glioblastoma u odnosu na tkivo meningeoma.

Da se uporedi aktivnost antioksidativnog enzimskog zaštitnog sistema u krvi i tkivu pacijenata obolelih od glioblastoma i meningeoma.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je ovo prospektivno istraživanje obavljeno u period od 2004. do 2009. godine na Neurohirurškoj klinici Klini kog Centra Srbije i u laboratoriji Instituta za farmakologiju, klini ku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. U ovom istraživanju analizirani su uzorci periferne venske krvi i tumorskog tkiva glioblastoma ili meningeoma 134 ispitanika oba pola, starosti od 18 do 70 godina. Na osnovu precizno postavljene dijagnoze (CT ili MRI i histopatološke analize tkiva) ispitanici su podeljeni u dve istraživane grupe operisanih pacijenata po 67 obolelih od malignog tumora mozga – glioblastoma i benignog tumora mozga – meningeoma. Kontrolnu grupu je činilo 30 zdravih ispitanika, adekvatnog uzrasta i pola, nepuša a koji u poslednjih 6 meseci nisu uzimali vitamine, dodatke u ishrani ili lekove sa antioksidativnim dejstvom. Odabir pacijenata izvršen je Neurohirurškoj klinici Klini kog centra Srbije na osnovu kriterijuma za uključivanje u ispitivanje (CT ili MRI i histopatološka analiza tkiva) i kriterijuma za neuključivanje u ispitivanje (hronična oboljenja koja mogu poremetiti redoks ravnotežu, virusna infekcija, terapija lekovima sa antioksidativnim dejstvom, kontinuirana suplementacija vitaminima pušenje), kao i tip operativnog lečenja glioblastoma i meningeoma (makroskopski totalna resekcija tumora, subtotalna resekcija tumora, biopsija tumora). Kod svih operisanih pacijenata korišćene su najsavremenije neurohirurške procedure uključujući i elektrokoagulaciju i elektrokortikostimulaciju. Svi pacijenti su operisani u opštoj intravenskoj anesteziji bez dodavanja isparljivih anestetika. Histopatološka klasifikacija svih ispitivanih tumora u ovoj studiji se zasniva na Klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije

(WHO) iz 2002. godine. Biohemijskim procedurama određivana je aktivnost antioksidativnih enzima iz eritrocita, zatim iz tkiva glioblastoma i meningeoma. Statistička obrada rezultata je zasnovana na izračunavanju dovoljnog broja ispitanika u istraživanju sprovedeno na osnovu pilot studije kod 30 ispitanika : 15 sa glioblastomom i 15 sa meningeomom. Pri analizi podataka primenjene su osnovne metode deskriptivne statistike : srednja vrednost (\bar{X}) sa merama disperzije (standardnom greškom (SE), standardnom devijacijom (SD), rasponom varijacije Min-Max i vrednostima medijane (Med) i moda (Mod)). Normalnost raspodele je testirana Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testom. Za testiranje statističke značajnosti i proveru hipoteza su korišćeni sledeći statistički testovi : Studentov t-test (parametrijski test) za zavisne i nezavisne uzorke, analiza varijanse (ANOVA), jednofaktorska i dvofaktorska sa pratećom *a priori* Boniferonijevom t procedurom i *post hoc* Tuckey HSD, LSD i Dunnett-ovim testom za višestruka poređenja u grupama. Kvalifikacija povezanosti između varijabli biće potvrđena Pirsonovom linearnom korelacijom. Baza podataka i analiza rezultata je izvršena pomoću softverskog paketa SPSS 10.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

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 153 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje je pokazalo da je važno napomenuti da iako određena veoma mala količina podataka postoji na ovu temu, naša studija je prva koja se usresredila i jasno definisala kao cilj poređenja Glioblastoma multiforme (kao primera malignog tumor mozga) i meningeoma (primer benignog tumora mozga). Osim toga, naše studija jedina zadovoljava svojom sistematičnošću kao i statističkom snagom, gde je kada se uzmu u obzir sve dosadašnje redoks studije na bilo kom tipu tumora mozga, ovo najverovatnije sistematska studija sa

brojem u esnika/uzoraka dovoljnim da ispuni uslove stroge biostatisti ke analize, gde je na osnovu preliminarnih rezultata na po 15 uzoraka iz svake grupe utvr eno da najmanji broj uzoraka po grupi neophodan za adekvanu statistiku iznosi 67, koliko u esnika smo i imali u studiji.

Krv obolelih od Glioblastoma multiforme i meningeoma pokazuje o igledan otklon od fiziološkog redoks stanja. U oba slu aja je uo eno zna ajno smanjenje aktivnosti SOD i CAT, a pove an nivo GR i GSH. GSH-Px je pokazala identit ne aktivnosti u svim grupama uzoraka. Prvi zaklju ak koji se iz ovoga može izvesti je da u tumorskom tkivu postoje patološki redoks proces koji se reflektuju na eritrocite tokom kontakta u okviru tumorske cirkulacije. Analiza AOS eritrocita se razlikuje u odnosu na analizu u tkivima, jer eritrociti nemaju *de novo* sintezu enzima, te se svaka smanjena aktivnost primarno može pripisati direktnoj inhibiciji. Aktivacija enzima se može povezati sa deinhibicijom, ali se rezultati ne smeju posmatrati jednozna no, odnosno moraju se postaviti u odre eni (pato)fiziološki kontekst. U skladu sa navedenim, iz dobijenih rezultata se može izvesti da se tkiva glioblastoma i meningeoma karakterišu pove anom produkcijom H_2O_2 i NO, koji "cure" u cirkulaciju i uti u na AOS u eritrocitima. Konkretno, H_2O_2 je inhibitor SOD (i to specifi no CuZn SOD koja je karakteristi na za eritrocite), dok je NO inhibitor CAT. U ovakvim uslovima, sa inhibiranim enzimima zaduženim za zaštitu kako od endogenog oksidativnog stresa (kroz auto-oksidaciju oksihb), tako i od H_2O_2 koji dolazi iz spoljne sredine (tj. tkiva), mora do i do kompenzacije. Kako razvoj tumora mozga nije akutni doga aj, odnosno zahteva odre en duži vremenski period, ima dovoljno vremena da promenjeni redoks uslovi u krvi uti u na proces eritropoeze, te da se eritrociti zamene novom generacijom koja je bolje opremljena za borbu sa tumor-indukovanim oksidativnim stresom. Ovde se vidi poštovanje odre ene fiziološke "logike". Naime, pove an nivo CAT ne bi imao efekta, jer bi i ve e koli ine CAT bile barem delimi no inhibirane. Zato se kompenzacija javlja u vidu pove anja GR aktivnosti, i sa tim u vezi višim nivoom GSH, koji može H_2O_2 da uklanja kroz aktivnost GSH-Px, ali i direktnim skevindžingom (ovo važi i za ROS, a i NO se može vezati za GSH). Važno je napomenuti da ONOO⁻ koji je inhibitor GR ne može da napusti tkivo zbog negativne šarže. Ve i nivo GR i GSH u krvi obolelih od Glioblastoma multiforme u odnosu na meningeom jasno ukazuje da je kod glioblastoma neophodna ja a kompenzacija, odnosno da je oksidativni pritisak koji ovo

tumorsko tkivo vrši ne nivo eritrocita ve i. Ukratko, u glioblastomu se produkuje više H_2O_2 (a verovatno i NO) u odnosu na tkivo meningeoma. Prepostavljeni ve i oksidativni pritisak je u skladu i sa korelacionom analizom, koja je pokazala da je AOS sistem više narušen u krvi obolelih od Glioblastoma multiforme u odnosu na meningeom.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Relativno mali broj radova je ispitivao promene aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u krvi i tkivu bolesnika sa glioblastomom i meningeomom. Wo niak i kolege su našli pove anu SOD aktivnost u eritrocitima obolelih od glioblastoma ($n = 9$) u odnosu na zdrave kontrole ($n = 20$). Aktivnost CAT se nije razlikovala. Rao i saradnici su pokazali smanjenu SOD i GR aktivnost u eritrocitima obolelih od menigeoma ($n = 28$) u odnosu na kontrole ($n = 48$). CAT je bila niža u meningeomu, ali ne statisti ki signifikantno, dok GSH-Px nije pokazala nikakvu razliku u odnosu na kontrolne vrednosti. U kontekstu pore enja maligni vs. benigni tumori mozga, nisu uo ene zna ajne razlike u AOS. Dakle po pitanju CAT i GSH-Px prethodni rezultati su sli ni našim. Rezultati za SOD se nisu slagali me u studijama, što se može objasniti i malim brojem uzoraka i mogu e neadekvatnom primenom biohemijskog eseja za SOD, gde se zahteva visoka stru nost i pažnja. Kona no razlike u nalazima za GR, s obzirom da je re o kompenzatorskim procesima, mogu poticati od razli itog perioda trajanja oboljenja.

Što se ti e tkiva, ovde smo se ograni ili na pore enje AOS sistema u timorskom tkivu Glioblastoma multiforme i meningeoma. Smatrali smo da kadaveri no tkivo dobijeno autopsijom ne predstavlja adekvatnu kontrolu. Peritumorsko tkivo je predstavljalo mogu u alternativu, ali s obzorom na blizinu tumora, verovatno je kao i krv izloženo oksidativnom pritisku, te bi koriš enjem vrednosti za AOS enzime moglo da do e do pogrešne interpretacije. Dok se SOD i CAT nisu razlikovali u aktivnosti u glioblastomu i meningeomu, rezultati su pokazali da je GSH sistem, odnosno aktivnosti GSH-Px i GR kao i nivo GSH zna ajno šiftovan ka manjim vrednostima u glioblastomu. Korelaciona analiza je pokazala da u meningeomu ne postoji veza izme u bilo kog para AOS komponenata. U glioblastomu je

Uočena značajna negativna korelacija između SOD i CAT aktivnosti. Dakle, veća SOD aktivnost za sobom povlači i manju SOD aktivnost, i obratno manja SOD aktivnost ide u paru sa većom CAT aktivnošću. Ovo je jako zanimljiv nalaz u kontekstu studije koja je pokazala da se glioblastomi mogu podeliti u dve grupe prema sadržaju SOD koji su povezani sa "boljom" (manje SOD) i "lošijom" prognozom (više SOD). Naši rezultati pokazuju da je viša aktivnost SOD povezana sa smanjenom CAT aktivnošću, što jasno vodi do hiperprodukcije H_2O_2 u toj grupi (subtipu) glioblastoma. Ukratko, čini se da je veća produkcija H_2O_2 u glioblastomu povezana sa "lošijom" prognozom, odnosno kraćim periodom preživljavanja pacijenata obolelih od glioblastoma. Smanjena GR aktivnost u tkivu glioblastoma u odnosu na meningeom može da implicira povećanu produkciju $ONOO^-$, GR inhibitora. Iako ovo može predstavljati jedan od osnovnih razlika, čini se da nije dominantan jer kod glioblastoma nije reč o izolovanoj inhibiciji jednog enzima, već o sistemski supresovanom tkivnom GSH sistemu, naravno relativno u odnosu na meningeom. Naš nalaz je u skladu sa ranijom studijom Tanriverdija i kolega koji su (na mnogo manjoj populaciji, oko 20 pacijenata po grupi) pokazali da glioblastom u odnosu na meningeom ima manju GSH-Px i GR aktivnost. Međutim aktivnosti su i dalje bile oko dva puta veće u odnosu na kontrolno tkivo. GSH-Px i GR i troše i obnavljaju GSH, ali velika produkcija H_2O_2 prevlađuje ovaj sistem, što rezultuje u tome da nivo GSH bude manji u glioblastomu u odnosu na normalno tkivo. Manja aktivnost GSH sistema u glioblastomu u odnosu na meningeom uočena ovde, implicira da maligni profil tumorskih ćelija koriguje svoj AOS u cilju promocije produkcije H_2O_2 . Naravno, određeni nivo anti- H_2O_2 aktivnosti je neophodan kako bi se sprečila autodestrukcija. Drugi potencijalni uzrok manje aktivnosti GSH sistema u glioblastomu je preusmeravanje cisteina (GSH progenitora) u metabolički put za proizvodnju cisteinske sulfonične kiseline, koja je uključena u nastanak i rast tumorskih ćelija agresivnog profila.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Vojislav Bogosavljevi** , Goran Tasi , Branislav Nestorovi , Vladimir Jovanovi , Miodrag Raki , Miroslav Samardži . Surgical Treatment of Glioblastoma Multiforme Localized in the Motor Area of the Brain Using the Technique of Cortical Electrostimulation. (rad je publikovan u Turkish Neurosurgery 2012, Vol:22, No:2,1-6)
2. **Vojislav Bogosavljevi** , Milica Bajeti , Ivan Spasojevi . Comparative analysis of antioxidative systems in malignant and brain tumours (rad je prihvaćen za publikovanje dana 16.09.2014. u Redox report-u).

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Promene aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u krvi i tkivu bolesnika sa glioblastomom i meningeomom**“ dr Vojislava Bogosavljevi predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju mehanizama antioksidativne zaštite u krvi i tkivu bolesnika sa glioblastomom i meningeomom. Ovim istraživanjem rasvetljeni su neki mehanizmi antioksidativne zaštite u krvi i tkivu bolesnika sa tumorima mozga uopšte, kao i specifičnosti istih kod glioblastoma i meningeoma i pružene su smernice za dalje istraživanje. Rezultati ove doktorske disertacije bi mogli da pomognu u ranom prepoznavanju promena u eritrocitima kod pacijenta obolelih od tumora mozga jer su oni izloženi povišenom nivou oksidacije tj. oksidativnom stresu.

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 i zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati

doktorsku disertaciju dr Vojislava Bogosavljevića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 01.10.2014.

Članovi Komisije:

Prof. dr Vaso Antunović

Doc. dr Miloš Joković

VNS Aleksandra Nikolić -Koki

Mentor:

Prof. dr Miodrag Rakić

Komentor:

Prof. dr Milica Bajetić
