

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nau nog Ve a Medicinskog fakulteta , održanoj dana 28.04.2016.godine (broj 5940/04), imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**“Uloga citomegalovirusa i Epštajn-Bar virusa u nastanku i progresiji  
karcinoma pljuva nih žlezda”**

kandidata Asist. dr Milene Radunovi , doktora medicine i specijaliste mikrobiologije i parazitologije, zaposlene na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu u zvanju asistenta za Nau nu oblast mikrobiologija. Mentor doktorske disertacije je Prof. dr Ivana Novakovi , a komentor Doc. dr Nada Tomanovi .

Komisija za ocenu završne doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Maja upi , profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Milovan Dimitrijevi , profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Doc. dr Sanja Radojevi -Škodri , docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. Prof. dr Dušan Pavlica, profesor Stomatološkog fakulteat Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Amelia Kataldi, profesor na Univerzitetu “Gabriele d’ Annunzio” u Kjeti-Peskari u Italiji

Na osnovu analize proložene doktorske disertacije Komisija za ocenu završne doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija Asist. dr Milene Radunovi napisana je na 158 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 18 slika, 50 tabela i 9 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na engleskom i srpskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** su prikazani osnovni podaci o karcinomima pljuva nih žlezda, koji su retki tumori i koji se od tipa do tipa odlikuju razli itim morfološkim karakteristikama, razli itim klini kim tokom i još uvek nerazjašnjenom etiologijom, iako je u malom broju slu ajeva pokazana veza njihovog

nastanka i uticaja određenih faktora spoljašnje sredine. Dat je dosadašnji pregled literature o ulozi i povezanosti infektivnih agenasa sa pojavom karcinoma, posebno Epstein-Bar virusa (EBV) i citomegalovirusa, koji u različitim tkivima mogu uticati na pojačanu ekspresiju IL-6, NF- $\kappa$ B, MMP-2 i MMP-9, proteina koji su u tesnoj vezi sa pojedinim tipovima karcinoma. Postavljena je radna hipoteza da CMV i EBV mogu izazvati zapaljenje i deregulaciju gena koji su uključeni u ćelijsku proliferaciju i tako indukovati razvoj karcinoma pljuvačinih žlezda.

**Ciljevi rada** su precizno i jasno definisani: da se ustanovi prisustvo CMV i EBV u tkivu karcinoma pljuvačinih žlezda, da se uporedi imunohistohemijska i nested PCR detekcija CMV i EBV u karcinomu pljuvačinih žlezda, da se ispita ekspresija virusnih proteina u različitim histološkim tipovima karcinoma pljuvačinih žlezda, da se ispita imunohistohemijska ekspresija prognostičkih markera IL6, MMP2, MMP9 i NF- $\kappa$ B u tkivu tumora, da se ispita povezanost prisustva CMV i EBV sa imunohistohemijskom ekspresijom pomenutih prognostičkih markera i da se analiziraju polimorfizmi IL6, MMP2 i MMP9 gena i ispita povezanost utvrđenih polimorfizama sa odgovarajućom proteinskom ekspresijom.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da ispitivanje predstavlja studiju preseka koja obuhvata 93 pacijenata sa karcinomom pljuvačine žlezde koji su operisani u skladu sa etičkim principima na Klinici za otorinolaringologiju i maksilofacialnu hirurgiju, Kliničkog centra Srbije u periodu od 2004. do 2013. godine. Precizno je opisana metodologija imunohistohemijskog bojenja tkiva tumora pljuvačinih žlezda i tkiva 20 pljuvačinih žlezda dobijenih prilikom autopsije, u kojima nije bilo maligniteta, koji su služili kao kontrolna grupa. U genetskom ispitivanju DNA polimorfizama, kontrolnu grupu su činili brisevi bukalne sluznice 100 zdravih volontera, koji su po polu i uzrastu odgovarali pacijentima u studiji. Imunohistohemijskom i nested PCR metodom rađena je detekcija CMV i EBV. Za ekspresiju IL6, MMP2, MMP9 i NF- $\kappa$ B korišćena je imunohistohemija.

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 i podstiču na dalja istraživanja.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 264 referenci.

## B) Kratak opis postignutih rezultata

Imunohistohemijski CMV antigeni su detektovani u 66 od 92 slu aja karcinoma pljuva ne žlezde (71.7%), dok su svi kontrolni slu ajevi bili negativni. CMV je eš e bio prisutan u adenoidno cisti nom karcinomu nego u drugim histološkim tipovima ( $p < 0.05$ ). EBV je detektovan u 32 (34,8%) od 92 slu aja i u 1 kontrolnim slu aju. Rezultati nested PCR ispitivanja se nisu zna ajno razlikovali od imunohistohemijskih. U 16 od 92 (17.4%) slu ajeva tumora pljuva nih žlezda nije na ena ekspresija ni CMV ni EBV virusnih antigena, dok je u 76 slu ajeva (82.6%) detektovana ekspresija antigena bar jednog od ispitivanih virusa. U 22 slu aja na ena je ekspresija i CMV i EBV antigena.

Imunohistohemijska pozitivnost i intenzitet ekspresije IL-6 i NF B bili si zna ajno viši u karcinomima pljuva nih žlezda nego u kontrolnim sl ajevima ( $p < 0.01$ ), dok se ekspresija MMP-2 i MMP-9 nije razlikovala u tumorima i kontrolnoj grupi. U slu ajevima tumora pljuva nih žlezda u kojima je na ena CMV pozitivnost zapažena je zna ajno ve a ekspresija IL-6, NF B i MMP-2 ( $p < 0.01$ ), dok razlika u ekspresiji MMP-9 u kontrolnoj grupi i slu ajevima karcinoma nije prime ena. Nije utvr ena razlika ekspresije ni jednog prognosti kog markera izme u EBV pozitivnih i EBV negativnih slu ajeva karcinoma pljuva nih žlezda. Me utim, u slu ajevima u kojima je na ena ekspresija i CMV i EBV antigena, ekspresija IL-6, NF B i MMP-2 je bila ve a nego u slu ajevima u kojima je na ena samo ekspresija CMV antigena. C alel IL-6 -174G>C polimorfizma pove ava rizik oboljevanja od carcinoma pljuva ne žlezde i u formi homozigota CC i heterozigota GC. Pove an rizik je potvr en i u dominantnom modelu (OR 3.77, 95% CI 1.91-7.44,  $p < 0.001$  za CT+TT genotip). T alel MMP-2 -1306 C>T polimorfizma pokazuje efekat u heterozigotnim nosiocima, pove evaju i rizik za dobijanje carcinoma pljuva ne žlezde (OR 1.98, 95% CI 1.07-3.65,  $p = 0.03$ ). Prema dominantnom modelu, CT+TT genotipovi imaju 2 puta ve i rizik od razvijanja carcinoma pljuva ne žlezde ( $p = 0.02$ ). Prema dominantnom modelu, CT+TT genotipovi imaju 2 puta ve i rizik od razvijanja carcinoma pljuva ne žlezde ( $p = 0.02$ ). Prema dominantnom modelu MMP2 -1575 G>A polimorfizma, osobe koje poseduju GA+AA genotipove pokazuju 1.77 puta ve i rizik od razvitka kancera, ali je statisti ka zna ajnost grani na ( $P = 0.049$ ). Heterozigotni nosioci T alela MMP-9 -1562 C>T polimorfizma imaju oko 2 puta ve i rizik od oboljevanja od carcinoma pljuva ne žlezde u pore enju sa nosiocima homozigota CC ( $p = 0.02$ ). Me utim, ni jedan od ispitivanih genotipova IL-6 i MMP-2 gena nije povezan sa ve om ekspresijom svog proteinskog produkta, dok je CC genotip MMP-9 -1562 C>T polimorfizma povezan sa ja om ekspresijom MMP-9, ali je statisti ka zna ajnost grani na ( $p = 0.049$ ).

### C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Iako CMV nije dokazan uzročnik humanih karcinoma, u skorije vrijeme podaci iz literature pokazuju da je infekcija CMV povezana sa brojnim malignitetima, kao što su karcinom dojke, kolona, prostate, mozga i pluća (Bishop i sar., 2015) (Richardson i sar., 2015) (Söderberg-Nauclér i Johnsen, 2015) (Arastefar i sar., 2015). Detaljno istraživanje uloge CMV kod mukoepidermoidnog karcinoma pljuvačne žlezde pokazalo je da je CMV prisutan u 97% tumorskih ćelija, dok okolno nemaligno tkivo nije bilo zahvaćeno (Melnick i sar., 2012). U ovoj studiji ekspresija proteina CMV je nađena u 71% slučajeva. Rezultati nested PCR-a i imunohistohemije u ovoj studiji pokazuju visok stepen poklapanja (94%). Na materijalu dobijenim iz parafinskih kalupa, u prošlosti je PCR metoda bila manje osjetljiva u detekciji CMV od imunohistohemije (Kandiel i Lashner, 2007). Međutim, razvojem novih tehnika, kao što je nested PCR ili real-time PCR značajno je porasla i osjetljivost detekcije DNK iz parafinskih kalupa (Mills i sar., 2013).

Pored uloge u razvitku maligniteta limfoidnog tkiva, smatra se da EBV učestvuje u razvoju nekih epitelnih karcinoma, posebno karcinoma želuca i nazofaringealnog karcinoma (Pittaluga i sar., 1992). Prisustvo i uloga EBV su istraživani i u drugim epitelnim malignitetima, kao što su karcinom dojke, pluća, prostate i skvamocelularni karcinom usne duplje (Bonnet i sar., 1999) (Kim i sar., 2005). U ovom istraživanju ekspresija EBV LMP1 proteina je nađena u 32 od 92 slučajeva karcinoma pljuvačne žlezde (34,8%). Rezultati nested PCR-a i imunohistohemije u ovoj studiji pokazuju visok stepen poklapanja (94,6%), što odgovara nalazima drugih autora (Liu i sar., 2003).

Uloga IL-6 kao faktora rasta učestvuje u malignim oboljenjima, kao što su karcinom bubrega (Yoshida i sar., 2002), karcinom prostate (Hobisch i sar., 2000), skvamocelularni karcinom orofaringealne regije (John i sar. 2004), karcinom dojke (Garcia-Tunon i sar., 2005) i tumorima pljuvačnih žlezda (Leivo i sar., 2005). U ovom istraživanju pokazana je statistički visoko značajna veza između nivoa i intenziteta ekspresije IL-6 i karcinoma pljuvačne žlezde. Ispitivana je uloga genskog polimorfizma IL-6 -174G>C kao predisponirajućeg faktora za karcinom pljuvačne žlezde. U ovoj studiji C alel je povezan sa većim rizikom od dobijanja karcinoma pljuvačne žlezde. Podaci iz literature vezani za ovaj polimorfizam su kontradiktorni. Jedna meta analiza nije našla vezu ovog polimorfizma sa povećanim rizikom oboljevanja od karcinoma prostate. (Yang, Li i Li, 2014). Druga meta analiza ovog polimorfizma je pokazala da je GG genotip povezan sa povećanim rizikom oboljevanja od hepatocelularnog karcinoma (Liu i sar., 2014). Studija na nesitno ćelijskom karcinomu pluća pokazala je da je rizik oboljevanja od ovog karcinoma povećan kod pušača koji imaju -174C alel (Bhat i sar.,

2015). U ovoj studiji pronađena je visoka povezanost prisustva CMV i ekspresije IL-6, što odgovara rezultatima drugih autora (Melnick i sar., 2013).

Nuklearni faktor kapa B (NF- $\kappa$ B) je jedan od najvažnijih promotera rasta tumora. Povišen nivo NF- $\kappa$ B pronađen je u mnogim karcinomima kao što su karcinom dojke, (Chua i sar., 2007), pluća (Tew i sar., 2008), kolona (Scartozzi i sar., 2007). U ovoj studiji pronađen je visok procenat karcinoma pljuvačne žlezde koji je imao pozitivnu ekspresiju NF- $\kappa$ B (92.4%), dok je NF- $\kappa$ B bio eksprimiran samo u 10% slučajeva normalne pljuvačne žlezde. Pokazano je da CMV i EBV povećavaju količinu NF- $\kappa$ B u brojnim slučajevima, kao i da pozitivno utiču na njegovu aktivaciju. CMV pojačava aktivaciju signalnog puta NF- $\kappa$ B u inflamatornom karcinomu dojke (El-Shinawi i sar., 2013). U ovoj studiji ekspresija NF- $\kappa$ B je bila intenzivnija u slučajevima karcinoma pljuvačne žlezde u kojima je bio prisutan CMV, dok EBV nije imao uticaja na ekspresiju NF- $\kappa$ B.

Smatra se da MMP-2 i MMP-9 imaju značajnu ulogu u razvitku karcinoma. Nivo ovih proteina je povišen u brojnim karcinomima (Wiercinska i sar., 2011). Međutim, u ovoj studiji nije nađena razlika u ekspresiji MMP-2 i MMP-9 između grupe karcinoma pljuvačne žlezde i kontrolne grupe. Ispitivana je uloga genskih polimorfizama dva gena (MMP-2 and MMP-9) kao predisponirajućeg faktora za karcinom pljuvačne žlezde. Brojne studije pokazuju kontradiktorne rezultate o ulozi MMP-2 -1306 C>T polimorfizma u nastanku karcinoma. U nekim slučajevima prisustvo C alela je povezan sa povećanim rizikom nastanka karcinoma (Zhang i sar., 2011), dok je u drugim studijama da nosioci T alela imaju povećan rizik (Sharma i sar., 2012). Rezultati ove studije su pokazali da je rizik oboljevanja od karcinoma pljuvačne žlezde povećan kod nosioca MMP-2 -1306 CT i MMP-2 -1306 CT+TT genotipova. MMP-2 -1575G>A polimorfizam se pokazao kao vrlo bitan u razvoju određenih oboljenja kao što su metabolički poremećaji i kardiovaskularna oboljenja (Yadav i sar., 2014). Uloga ovog polimorfizma u nastanku karcinoma još nije ispitana. Rezultati ove studije nisu pokazali vezu ovog polimorfizma sa povećanim rizikom oboljevanja od karcinoma pljuvačne žlezde. S druge strane, ova studija je pokazala da su MMP-9 -1562 CT i MMP-9 -1562 CT+TT genotipovi povezani sa povećanim rizikom oboljevanja od karcinoma pljuvačne žlezde. I druge studije su pokazale povezanost -1562T alela sa povećanim rizikom oboljevanja od kardiovaskularnih oboljenja, karcinoma želuca, skvamocelularnog karcinoma glave i vrata (Zhang i sar., 2014) (Lee i sar., 2013). Suprotno ovim nalazima, Park i sar. (Park i sar., 2011) su pronašli da je MMP-9 -1562CC genotip češći i kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom.

## **D) Radovi prihvaćeni za publikaciju koji čine deo doktorske disertacije**

1. M. Radunovic, N. Nikolic, S. Milenkovic, N. Tomanovic, I. Boricic, M. Dimitrijevic, I. Novakovic, G. Basta-Jovanovic. The MMP-2 and MMP-9 Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Salivary Gland Cancer. Journal of BUON. 2016; 21 (3)
2. M. Radunovic, N. Tomanovic, I. Novakovic, I. Boricic, S. Milenkovic, M. Dimitrijevic, S. Radojević - Škodrić, Lj. Bogdanovic, G. Basta-Jovanovic. Cytomegalovirus induces Interleukin-6 Mediated Inflammatory Response in Salivary Gland Cancer. Journal of BUON. 2016; 21 (6)

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

Doktorska disertacija pod nazivom "The Role of Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in the Development and Progression of Salivary Gland Cancer" ("Uloga citomegalovirusa i Epštajn-Bar virusa u nastanku i progresiji karcinoma pljuvačkih žlezda") dr Milene Radunović, predstavlja originalni naučni doprinos razumevanju uloge citomegalovirusa i Epštajn-Barr virusa u nastanku i progresiji karcinoma pljuvačkih žlezda. Ovo istraživanje je pokazalo da je prisustvo i CMV i EBV bilo detektovano mnogo češće nego u tkivu normalne, neobolele pljuvačke žlezde. Kako se rezultati IHH i nested PCR poklapaju u velikom procentu, oba metoda se mogu koristiti u cilju detekcije prisustva virusa u tkivu fiksiranom formalinom iz parafinskih kalupa. IL-6 i NF- $\kappa$ B mogu se smatrati dobrim pozitivnim prognostičkim markerima za karcinome pljuvačkih žlezda, dok se ekspresija MMP-2 i MMP-9 ne razlikuje mnogo u karcinomima pljuvačkih žlezda i tkivu normalne, neobolele pljuvačke žlezde. Dok uticaj EBV nije pokazao značajniji efekat na ekspresiju bilo kog ispitivanog markera, u slučajevima karcinoma pljuvačkih žlezda u kojima je detektovana CMV pozitivnost detektovana je povišena ekspresija IL-6, NF- $\kappa$ B i MMP-2. IL-6 -174 G>C, MMP-2 -1306 C>T i MMP-9 -1562 C>T polimorfizmi genotipova pokazali su značajan uticaj na nastanak i razvoj karcinoma pljuvačkih žlezda, dok je uticaj MMP-2 -1575 G>A pokazao znatno manji značaj. Ni jedan od analiziranih polimorfizama nije pokazano da dovodi do povišene proteinske produkcije. Rezultati ove doktorske disertacije otvaraju nove pravce istraživanja i pomažu da se bolje razume uloga CMV i EBV u nastanku i progresiji karcinoma pljuvačkih žlezda.

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 savršena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni radkandidata, Komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerzziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Milene\_Radunovi \_ i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beogade,

lanovi Komisije:

Prof. dr Maja ūpi

---

Prof. dr Dušan Pavlica

---

Prof. dr Milovan Dimitrijevi

---

Doc. dr Sanja Radojevi -Škodri

---

Prof. dr Amelia Cataldi

---

Mentor

Prof.dr Ivana Novakovi

---

Komentor

Doc. dr Nada Tomanovi

---