

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj dana 28.04.2016. godine, broj 5940/4, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Značaj određivanja nivoa ekspresije Vilmsovog tumorskog gena 1 kod pedijatrijskih pacijenata sa akutnom leukemijom“

kandidata mr dr Srđe Jankovića, zaposlenog u Univerzitetskoj dečjoj klinici u Beogradu kao lekar specijalista imunologije. Mentor je Prof. dr Dragana Janić, a komentor N.Sav. dr Sonja Pavlović (Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo).

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ivana Novaković, Institut za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Nada Krstovski, Katedra za pedijatriju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragana Vučević, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu.

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

Izveštaj

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci Srđe Jankovića napisana je na 61 strani i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, pacijenti i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 4 grafikona, 8 tabela i 2 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je prikazana akutna dečja leukemija, kao najčešća grupa malignih oboljenja dečjeg doba, koja se deli na dve glavne podgrupe: akutnu mijeloidnu leukemiju (AML) i akutnu limfoblastnu leukemiju (ALL). Navedena su savremena saznanja o etiologiji i patogenezi AML, glavni načini klasifikacije, na čelu sa dopunjenom francusko-američko-britanskom (FAB) klasifikacijom, osnovne kliničke karakteristike bolesti, kao i uloga odgovarajućih dijagnostičkih metoda (imunofenotipizacija pomoću protočne citometrije, citogenetička i molekularno-genetička ispitivanja) koje omogućuju stratifikaciju pacijenata prema riziku koja se obavezno sprovodi u postojećim dijagnostičko-terapijskim protokolima. Dat je i pregled terapije koja se primenjuje kod ove grupe oboljenja prema BFM-AML-2004.

Na sličan način, opisana su savremena shvatanja etiopatogeneze ALL, imunofenotipska podela na B- i T-ćelijsku leukemiju, uz detaljniju podelu na podtipove prema stepenu zrelosti leukemijskih ćelija, osnovne kliničke karakteristike bolesti, kao i prognostička citogenetička i molekularno-genetička ispitivanja. Prikazano je i lečenje prema važećem protokolu BFM-ALL-IC-2009. Poseban odeljak posvećen je problematici praćenja minimalne rezidualne bolesti kod dečje leukemije i različitim metodama kojima se to može ostvariti.

Zatim je dat pregled postojećih saznanja o biološkim karakteristikama i fiziološkim ulogama Vilmsovog tumorskog gena (*WT*)-1 i istoimenog transkripcionog faktora, kao i do sada poznatim asocijacijama ovog molekula sa različitim malignim procesima. Reč je o transkripcionom činiocu koji se odlikuje cinkovim prstastim (eng. *zinc finger*) domenom, opsežno uključenim u procese hematopoeze i ćelijske diferencijacije. Naročito je istaknuta dvojna uloga *WT1* u tumorogenezi, odnosno mogućnost da se ovaj protein u određenim kontekstima ponaša kao proto-onkogen, a u drugim kontekstima pokazuje sva obeležja tumorsupresorskog gena. Ukratko su navedeni potencijalni biološki mehanizmi u osnovi opisanog dvojakog delovanja *WT1*, kao što je njegova uloga u indukciji apoptoze pod odgovarajućim uslovima. Pomenuto je i postojanje četiri različite izoforme *WT1*, za koje postoje naznake da bi mogle da imaju različite efekte na nivou regulacije transkripcije ciljnih gena. Na kraju uvoda, dat je kratak pregled dosadašnjih istraživanja o uticaju ekspresije *WT1* na tok bolesti i ishod lečenja dečjih akutnih leukemijâ.

Ciljevi rada su precizno definisani. Oni obuhvataju ispitivanje razlika u ekspresiji gena i proteina *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi kod pacijenata obolelih od AML i ALL, u poređenju sa kontrolnom grupom sastavljenom od dece podvrgnute aspiraciji koštane srži radi postavljanja dijagnoze imunske trombocitopenijske purpore (ITP); ispitivanje razlika u ekspresiji gena i proteina *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi između pacijenata sa AML različitog tipa po

klasifikaciji FAB i/ili različitog genetičkog nalaza; ispitivanje razlika u ekspresiji gena i proteina WT1 u koštanoj srži između pacijenata sa B- i T-ćelijskim tipom ALL; ispitivanje razlika u ekspresiji gena i proteina WT1 u koštanoj srži pri dijagnozi u odnosu na dostizanje pune remisije i ishod lečenja kod pacijenata sa AML, B- i T-ćelijskom ALL; ispitivanje razlika u ekspresiji gena i proteina WT1 u koštanoj srži pri kontrolnim aspiracijama u odnosu na ishod lečenja kod pacijenata sa AML.

U poglavlju **pacijenti i metode** navedeno je da je deo ispitivanja (merenje ekspresije gena WT1) vršen u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, dok je drugi deo (detekcija proteina WT1 protočnom citometrijom) vršen u imunološkoj laboratoriji Službe za hematologiju i onkologiju Univerzitetske dečje klinike u Beogradu. Za učešće svih pacijenata u istraživanju obezbeđena je pisana saglasnost roditelja/staratelja nakon pune informisanosti, u skladu sa Helsinškom deklaracijom i preporukama Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji je odobrio istraživanje. Precizno je navedeno koji su podaci iz istorija bolesti prikupljeni za potrebe istraživanja.

Ispitanici u istraživanju obuhvatili su 20 dece obbolele od AML (12 dečaka i 8 devojčica) uzrasta 3-16 godina (medijana 9 godina 6 meseci) i 20 dece sa ALL (11 dečaka i 9 devojčica) uzrasta od 11 meseci do 17 godina (medijana 5 godina). Kontrolna grupa je formirana od 15 dece usklađenog pola i uzrasta koja su podvrgnuta aspiraciji koštane srži radi postavljanja dijagnoze ITP. Ovaj izbor kontrolne grupe diktiran je činjenicom da se zdrava deca ne podvrgavaju aspiraciji koštane srži, kao i time što se ovo oboljenje odlikuje normalnim nalazom koštane srži. Pacijenti sa AML podeljeni su u podgrupe prema klasifikaciji FAB (M1/M2 5, M3 6, M4 2 i M5 7), dok su pacijenti sa ALL podeljeni na podgrupu sa B-ćelijskom ALL (16) i T-ćelijskom ALL (4). Dijagnoza je kod sve dece postavljena u Univerzitetskoj dečjoj klinici u periodu od aprila 2011. do februara 2016. Deca sa AML lečena su po protokolu BFM-AML-2004, a deca sa ALL po protokolu BFM-ALL-IC-2009.

Redovne laboratorijske analize koje su deo dijagnostičke obrade pedijatrijskih pacijenata sa akutnom leukemijom (imunofenotip, kariotip i molekularno-genetičko ispitivanje prisustva genskih rearanžmana *PML/RAR α* , *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11* i *FLT3-ITD* kod AML, odnosno *TEL/AML1*, *MLL/AF4*, *BCR/ABL* i *PBX2/E2A* kod ALL) su navedene, uz opis radnih principa, načina izvođenja i kliničkog značaja.

Korišćene metode za određivanje ekspresije gena *WT1* (lančana reakcija polimeraze sa reverznom transkripcijom) i detekciju proteina WT1 (indirektna imunofluorescenca na bazi protočne citometrije) posebno su opisane, kao i statističke metode koje su korišćene radi obrade podataka i testiranja značajnosti dobijenih razlika (Man-Vitnjev U test i Fišerov test tačne verovatnoće), uz obrazloženje izbora ovih testova.

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 123 reference koje brojem, kvalitetom i savremenosti zadovoljavaju potrebu za pružanjem zaokružene slike o aktuelnom trenutku u vezi sa postavljenim istraživačkim problemom.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje je pokazalo da je ekspresija gena *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi statistički značajno veća kod pedijatrijskih pacijenata sa AML u poređenju sa pacijentima sa ALL i kontrolnoj grupi (pacijenti sa ITP). Kod 16 dece sa AML koja su ušla u punu remisiju bolesti, ekspresija gena *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi bila je niža nego kod četvoro dece koja su preminula ne ušavši u remisiju; međutim, ova razlika nije bila statistički značajna. Ekspresija gena *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi kod 14 dece sa AML koja su bila živa u trenutku analiziranja podataka (medijana praćenja 1 godina 6 meseci) bila je niža nego u grupi od ukupno šestoro dece koja su podlegla bolesti; ni ovde razlika nije bila statistički značajna. U grupi dece sa AML čija je ekspresija gena *WT1* u koštanoj srži bila u četvrtom kvartilu, petoro od sedmoro je bilo u životu na kraju perioda praćenja, dok je u grupi čija je ekspresija gena *WT1* pri dijagnozi bila unutar prva tri kvartila do kraja praćenja preživelo devetoro od 13; ni ova razlika nije bila statistički značajna.

U grupi od šestoro dece sa akutnom promijelocitnom leukemijom (AML M3), koja je kod sve ove dece potvrđena nalazom genskog rearanžmana *PML/RAR α* , pokazala je tendenciju ka visokim vrednostima ekspresije gena *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi, ali usled malobrojnosti podgrupe nije dosegla statističku značajnost. Nešto niže vrednosti ekspresije *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi, takođe bez statističke značajnosti razlike u odnosu na druge podgrupe, nađene su za sedmoro dece sa AML M5, dok su vrednosti ekspresije gena *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi u podgrupi od petoro dece sa AML M1/M2 bile niske. Dvoje dece sa AML M4 drastično su se razlikovali u nivou ekspresije gena *WT1* pri dijagnozi, pri čemu je kod jednog od ovih dvoje dece zabeležena i najviša vrednost ekspresije gena *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi u čitavoj seriji.

Kod četvoro dece sa T-ćelijskom ALL, nivo ekspresije gena *WT1* pri dijagnozi bio je upadljivo (za više od 3 x SD) veći kako od medijane u kontrolnoj grupi (ITP), tako i od medijane nivoa ekspresije *WT1* koji je zabeležen kod 16 dece sa B-ćelijskom ALL. Međutim, vrednosti koje su za više od 3 x SD veće od medijane ekspresije *WT1* u kontrolnoj grupi zabeležene su i kod četvoro od 16 pacijenata sa B-ćelijskom ALL. Troje od četvoro dece sa T-ćelijskom ALL bilo je živo i bez znakova bolesti na kraju perioda praćenja (medijana praćenja 2 godine), kao i četrnaestoro dece sa B-ćelijskom ALL (preostalih dvoje su izgubljeni za praćenje usled prevođenja u drugu zdravstvenu ustanovu).

Kod većine pacijenata sa AML (15), prva kontrolna aspiracija koštane srži izvršena je mesec dana po postavljanju dijagnoze. Dalja kontrolna ispitivanja su preduzimana po potrebi, u različitim intervalima. Svega dvoje od petoro dece kod koje se nivo ekspresije gena *WT1* u koštanoj srži mesec dana po postavljanju dijagnoze nalazio u četvrtom kvartilu bilo je živo u vreme analiziranja, dok je 10 od 10 dece sa nivoom ekspresije gena *WT1* u koštanoj srži mesec dana po postavljanju dijagnoze preživelo period praćenja. Usled malog broja ispitanika, ova

razlika nije dostigla statističku značajnost (Fišerovim testom tačne verovatnoće dobijen je rezultat $p=0,0952$).

Protein WT1 je detektovan pri dijagnozi u leukemijskim ćelijama kod 16 dece sa AML i svih četvero dece sa T-ćelijskom ALL. Kod dece sa B-ćelijskom leukemijom, čak ni kod četvero sa značajno višom ekspresijom gena *WT1* od ostalih, protein WT1 nije detektovan. Takođe, protein WT1 nije detektovan u uzorcima dobijenim kontrolnim pregledima koštane srži.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa podacima iz literature

U istraživanju iz ove doktorske disertacije nađena je značajno viša ekspresija gena *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi kod pedijatrijskih pacijenata sa AML u poređenju sa onima sa ALL i kontrolnom grupom (ITP). Ovo je prvo ispitivanje navedenog gena u opisanom kontekstu u populaciji dece u Srbiji, ali je u potpunoj saglasnosti sa dosadašnjim nalazima u drugim populacijama (Bergmann и сар., 1997; Rubnitz i Inaba, 2012; Ujj i сар., 2016). Iako bez statističke značajnosti, tendencija ka višim vrednostima ekspresije gena *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi kod pacijenata sa T-ALL takođe odgovara stanju koje je ranije opisano (Zhang i сар., 2015). Činjenica da je u ovom istraživanju relativno visok (>3 SD iznad medijane u kontrolnoj grupi) nivo ekspresije gena *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi uočen i kod četvero od 16 dece sa B-ćelijskom ALL slaže se sa objavljenim podacima koji govore u prilog mogućnosti da bi ekspresija *WT1* mogla da ima određenu dijagnostičku vrednost i kod dece obolele od ALL (Hagag i сар., 2016).

Iako u dosadašnjoj literaturi nema zabeleški o pokušajima odeđivanja ekspresije proteina WT1 protočnom citometrijom, postoji konceptualna sličnost sa jednim istraživanjem indijskih autora (Vora i сар., 2010), u kojem je protočnom citometrijom vršena kvantifikacija ekspresije produkta gena FLT3 u cilju dobijanja informacije od potencijalnog prognostičkog značaja, odnosno identifikovanja pacijenata sa povećanom ekspresijom FLT3 kod kojih bi mogla da postoji racionalna osnova za terapiju specifičnim inhibitorima FLT3. Ipak, za razliku od pomenutog istraživanja, određivanje ekspresije WT1 na nivou proteina protočnom citometrijom, koje je sprovedeno u istraživanju iz ove doktorske disertacije, nije dovelo do dovoljno konzistentnih rezultata da bi potvrdilo da se ovom metodom mogu dobiti klinički korisne informacije.

Uočena tendencija ka povezanosti višeg nivoa ekspresije gena *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi i lošijeg ishoda kod dece sa AML, mada bez dosezanja statističke značajnosti, u saglasnosti je sa podacima iz literature (Trka i сар., 2002; Garg i сар., 2003; Rodrigues i сар., 2007; Lyu i сар., 2014). Postoji, međutim, i jedna studija u kojoj je, naprotiv, visina ekspresije gena *WT1* u koštanoj srži dovedena u povoljniju prognozu kod dečje AML (Rodriguez i сар., 2007). Takođe, u nekim studijama nije nađena ni pozitivna ni negativna korelacija između visine ekspresije *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi i prognoze bolesti (Barragan i сар., 2004; Noronha i сар., 2009).

Činjenica da su nešto više vrednosti ekspresije *WT1* u koštanoj srži pri dijagnozi nađene kod AML tipa M3 po klasifikaciji FAB takođe je u saglasnosti sa podacima iz literature (Ho i сар., 2014). U literaturi takođe postoje podaci koji svedoče da je udružena pojava visoke

ekspresije *WT1* i interne tandem duplikacije u genu *FLT3* (*FLT3-ITD*) povezana sa lošijom prognozom (Balgobind i sar., 2011). Zapažanje kod pacijenta broj 15, koji je imao ova dva parametra i na kraju perioda praćenja nalazio se u stabilnoj remisiji slagalo bi se sa zapažanjem koje je izneto u jednoj seriji pedijatrijskih pacijenata u Turskoj (Coşkunpinar i sar., 2012). Međutim, pacijentkinja broj 11, koja je imala *FLT3-ITD* uz umerenu ekspresiju *WT1*, imala je nepovoljan ishod lečenja, što podvlači značaj individualnih razlika.

Asocijacija višeg nivoa ekspresije gena *WT1* pri prvoj kontrolnoj aspiraciji koštane srži i nepovoljnog ishoda (premda bez statističke značajnosti) takođe je u saglasnosti sa radovima koji su ispitivali mogućnost da se ekspresija gena *WT1* u koštanoj srži koristi kao marker MRB (Miyamura i sar., 2004; Lapillonne i sar., 2006; Cilloni i sar., 2009; Willasch i sar., 2009; Zhang i sar., 2015; Woehlecke i sar., 2015).

Podatak da je nivo ekspresije gena *WT1* u koštanoj srži kod pacijentkinje broj 18, kod koje je naknadno ustanovljeno prisustvo visokorizičnog genskog rearanžmana *MOZ/CBB* (što je učinjeno tokom ekstenzivne dijagnostičke obrade u inostranom centru tokom priprema za transplantaciju matične ćelije hematopoeze) bio blizak nuli u saglasnosti je sa istraživanjima (npr. Hecht i sar., 2015) gde je pokazano da je, pored visoke ekspresije *WT1*, i izuzetno niska ekspresija ovog gena potencijalni činilac nepovoljne prognoze.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Janković S, Marjanović I, Tošić N, Kotur N, Dokmanović L, Škorić D, Krstovski N, Lazić J, Rodić P, Pavlović S, Janić D. Wilms tumor (WT)-1 gene expression in children with acute leukemia in Serbia. *Genetika* 2016; 48(1):409-21.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Značaj određivanja nivoa ekspresije Vilmsovog tumorskog gena 1 kod pedijatrijskih pacijenata sa akutnom leukemijom“ dr Srđe Jankovića predstavlja originalni naučni doprinos upoznavanju ekspresije *WT1* kod pedijatrijskih pacijenata sa akutnom leukemijom u Srbiji i njene potencijalne povezanosti sa težinom bolesti, stepenom rizika i opštim ishodom lečenja. Rezultati istraživanja u celini ukazuju da bi ispitivanje nivoa ekspresije gena *WT1* u koštanoj srži moglo da bude korisna dopuna postojećim protokolima za dijagnostiku dečje AML, T-ćelijske ALL, kao i određene podgrupe pacijenata sa B-ćelijskom ALL, kao i potencijalni dopunski marker za praćenje MRB u protokolima lečenja akutnih dečjih leukemija. Rezultati istraživanja takođe naglašavaju značaj tumačenja podataka o ekspresiji *WT1* u okviru složenog i individualizovanog konteksta.

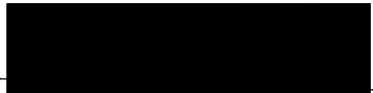
Ova doktorska disertacija je sačinjena u skladu sa svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni 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 Srđe Jankovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu,
24.05.2016.

Članovi komisije:

Prof. dr Ivana Novaković



Doc. dr Nada Krstovski



Prof. dr Dragana Vučević



Mentor:

Prof. dr Dragana Janić



Komentor:

N.Sav. dr Sonja Pavlović

