

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 07.03.2016. godine, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uloga glutathion transferaza kao biomarkera rizika za nastanak karcinoma jajnika”

kandidata mr sci. med Igora Plješa, zaposlenog u Kliničko-bolničkom centru Zemun, kao načelnik Službe za ginekologiju, primarijus, lekar specijalista ginekologije i akušerstva, subspecijalista onkologije. Mentor je prof. dr Milica Berisavac, a komentor je prof. dr Ana Savić-Radojević

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Dr Tatjana Simić, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
2. Dr Tatjana Pekmezović, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
3. Dr Vladimir Bošković, profesor u penziji Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci. dr Igora Plješa napisana je na 123 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 20 slika, 23 tabele i 6 grafikona. Doktorska

disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je opisan karcinom jajnika, dati najnoviji epidemiološki podaci i definisani potencijalni faktori rizika za nastanak karcinoma jajnika. Prikazana su i aktuelna saznanja o karcinogenezi i genetici ovih tumora. Opisani su simptomi i klinička slika oboljenja, kao i dijagnostički i terapijski postupci koji se primenjuju u različitim stadijuma tumora. Posebna pažnja je posvećena patohistološkoj klasifikaciji i histološkom gradiranju karcinoma jajnika, kao i određivanju stadijuma karcinoma jajnika, primenom FIGO sistema klasifikacije, prema kriterijumima Međunarodne federacije za Ginekologiju i akušerstvo (*Federation of Gynaecology and Obstetrics*), zasnovanim na nalazima dobijenim u toku hiruške eksploracije. Dat je i prikaz terapijskih protokola koji se koriste u lečenju ovog karcinoma, a ukazano je i na značaj razvoja metoda rane dijagnostike malignih tumora jajnika, prvenstveno zbog podmuklog toka bolesti bez simptoma u ranoj fazi i visoke stope smrtnosti. Iz tog razloga su prikazani aktuelni trendovi skrininga karcinoma jajnika, ali i prepreke u njihovom sprovođenju. Detaljno su opisane glutathion transgferaze (GST), velika superfamilija enzima koje učestvuju u reakcijama konjugacije ksenobiotika, uključujući i antitumorske lekove, sa glutathionom. Opisana je i značajna genetska heterogenost unutar različitih klasa GST, koje nastaju kao posledica genskih delecija ili polimorfizma jednog nukleotida, a dovode do potpunog odsustva ili izmenjene aktivnosti GST, što dalje može uticati na sposobnost biotransformacije kod pojedinih osoba i čini ih više sklonim razvoju karcinoma. U uvodu disertacije je dat pregled dosadašnje literature i predloženo je da su određene klase GST (M1, T1, P1 i O2) do sada ispitivane kao potencijalni pokazatelji rizika, dok uloga GSTA1 klase, koja utiče na ćelijsku redoks ravnotežu, još uvek nije potvrđena kod ovog karcinoma. Opisano je da pored uloge koju GST mogu imati u podložnosti za nastanak karcinoma, takođe mogu uticati i na odgovor na hemioterapiju, kao i na preživljavanje. Istaknuto je da je od velikog značaja identifikacija podgrupa pacijenata, obolelih od karcinoma jajnika koji mogu koristiti novotkrivene terapije prve linije, na osnovu njihovog kapaciteta detoksifikacije i sposobnosti maksimalnog iskorišćavanja primenjene antitumorske terapije, a smanjenja farmakotoksičnosti.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju individualnog i kombinovanog uticaja genskog polimorfizma *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTA1*, *GSTP1* i *GSTO2* na rizik za nastanak karcinoma jajnika, kao i povezanosti prisustva različitih genskih varijanti *GST* sa fenotipskom karakteristikama karcinoma jajnika. Takođe, cilj rada je bio i da se pokaže da li polimorfna ekspresija *GST* proteina klasa M1, T1, A1, P1 i O2 ima prognostički značaj kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika.

U poglavlju **Materijal i metode**, navedeno je da je za određivanje polimorfizama *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTA1*, *GSTP1* i *GSTO2* izvedena studija slučajeva i kontrola (eng. *case-control study*) u koju su bile uključene 103 pacijentkinje sa karcinomom jajnika, lečene u Klinici za ginekologiju Kliničko-bolničkog centra Zemun-Beograd, u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije i Institutu za onkologiju Vojvodine, i 178 kontrola. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (prema revidiranoj verziji iz 1983. godine) i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu. Detaljno je opisana metodologija izolacije DNK iz periferne krvi, a u cilju određivanja polimorfizama *GST*. Pored toga, opisana je metoda za ispitivanje delecioni polimorfizama *GSTM1* i *GSTT1* gena reakcijom lančanog umnožavanja (engl. *polymerase chain reaction*, *PCR*), kao i metode za određivanje polimorfizama jednog nukleotida, analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphism* – *PCR-RFLP*) za *GSTA1* gen, odnosno metodom qPCR (eng. *quantitative Polymerase Chain Reaction*) za *GSTP1* i *GSTO2* gene. Prediktivna vrednost različitih genotipova *GST* je procenjena Cox regresionim modelom, dok je *Kaplan Meier* analiza korišćena za utvrđivanje razlika u preživljavanju.

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. Naime, dobijeni rezultati ukazuju da su žene nosioci *GSTT1-aktivnog* genotipa u povećanom riziku za obolevanje od karcinoma jajnika u odnosu na žene sa *GSTT1-nultim* genotipom, što se pokazalo još više očigledno u podgrupi ispitanica sa pozitivnom porodičnom anamnezom, kod kojih je i *GSTO2-varijantni* genotip prepoznat kao determinanta rizika. Kada je

analizirana moguća povezanost tri GST genotipa (*GSTT1-aktivni*, *GSTA1-aktivni* i *GSTP1-referentni*), koji se kada su u kombinaciji mogu dovesti u vezu sa rizikom za obolevanje od karcinoma jajnika, učestalost ovog kombinovanog genotipa je bila značajno veća kod pacijentkinja sa karcinomom ovarijuma u odnosu na grupu kontrola. Pored toga, pokazana je i povezanost distribucije *GSTA1* genotipova sa FIGO stadijumom karcinoma jajnika, kao i da *GSTP1* polimorfizam može imati prognostički značaj u ovom karcinomu. Korišćena literatura sadrži spisak od 334 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje je pokazalo da nema značajne povezanost individualnih *GSTM1*, *GSTA1*, *GSTP1* i *GSTO2* genotipova sa rizikom za nastanak karcinoma jajnika ($p > 0,05$). Međutim, žene nosioci *GSTT1-aktivnog* genotipa su bile u 2-puta povećanom riziku za obolevanje od karcinoma jajnika (95%CI: 1,00-4,01, $p = 0,049$), što je bilo još očiglednije kod pacijentkinja sa pozitivnom porodičnom anamnezom karcinoma, a kod kojih se i *GSTO2-varijantni* genotip pokazao značajnim pokazateljem rizika (OR= 5,16, 95%CI: 0,99-26,89, $p = 0,050$). Učestalost tri GST genotipa koji se, u kombinaciji, mogu dovesti u vezu sa rizikom za obolevanje od karcinoma jajnika (*GSTT1-aktivni*, *GSTA1-aktivni* i *GSTP1-referentni*) je bila značajno veća u grupi pacijentkinja u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,042$). Štaviše, pacijentkinje nosioci ove kombinacije genotipa su predstavljale preko 64% od ukupnog broja pacijentkinja unutar bilo kog FIGO stadijuma. Kada je u pitanju individualna povezanost sa agresivnošću bolesti, samo se učestalost *GSTA1* genotipova mogla dovesti u vezu sa FIGO stadijumom karcinoma jajnika ($p = 0,047$). Pokazano je i da pacijentkinje nosioci *GSTP1 ValVal* genotipa imaju značajno kraće preživljavanje od nosilaca *GSTP1-referentnog* genotipa ($p = 0,032$).

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Tokom godina izveden je veći broj istraživanja koja su za cilj imala da se razjasni koji genetski faktor bi mogao predstavljati okidač za otpočinjanje procesa kancerogeneze u karcinomu jajnika. Nedavno su rezultati nekoliko istraživanja ukazali na značaj

polimorfizama glutation S-transferaza, koje zbog svoje značajne uloge u modulaciji bioloških efekata kancerogena, mogu uticati i na podložnost za nastanak karcinoma jajnika. Pažnja je posebno posvećena delecionim polimorfizmima glutation S-transferaza, *GSTM1* i *GSTT1*, s obzirom da kod nosilaca *GSTM1-nultog* i *GSTT1-nultog* genotipa postoji potpuno odsustvo enzimске aktivnosti, a samim tim i smanjena sposobnost ćelija da metabolišu toksine (Hayes i Strange, 2000). Međutim, postojeći rezultati o značaju ova dva polimorfizma u podložnosti za nastanak karcinoma jajnika su prilično nekonzistentni (Economopoulos i sar., 2010; Yin i sar., 2013; Xu i sar., 2014; Jin i sar., 2014). Rezultati dr Igora Plješa o odsustvu povezanosti *GSTM1* genskog polimorfizma sa rizikom za nastanak karcinoma jajnika u populaciji žena u Srbiji su u skladu sa rezultatima meta-analiza koje su izučavale povezanost delecionog polimorfizma *GSTM1* sa podložnošću za nastanak karcinoma jajnika (Economopoulos i sar., 2010; Yin i sar., 2013; Xu i sar., 2014; Jin i sar., 2014). Drugi najčešće ispitivani polimorfizam GST je *GSTT1*, čiji gen je prisutan u oko 80% populacije belaca, dok oko 10-20 % uopšte nema ovaj enzim, jer poseduje *GSTT1-nulti* genotip (Nelson i sar., 1995). Frekvenca *GSTT1-nultog* genotipa u kohorti (26%) ispitivanoj u ovom radu je nešto viša u odnosu na podatke koji su dobijeni kod belaca u srednjoj Evropi (18.1%) (Raimondi i sar., 2006). Kada je u pitanju populacija pacijentkinja sa karcinomom jajnika, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da su žene nosioci *GSTT1-aktivnog* genotipa u značajno povećanom riziku za obolevanje od karcinoma jajnika. Pomenuti rezultat može delovati kontradiktorno, imajući u vidu da veći broj kancerogena prisutnih u izduvnim gasovima i duvanskom dimu pripadaju grupi supstrata *GSTT1* (Meyer i sar., 1991; Hayes i Strange, 2000). Međutim, postoje jasni dokazi koji govore u prilog značajne uloge koju *GSTT1* enzim može imati u bioaktivaciji, umesto u detoksikaciji, određenog broja bifunkcionalnih alkilirajućih agenasa koji su prisutni u sredinskom zagađenju i nekim profesionalnim hazardima (Their i sar., 1996). Kao posledica procesa bioaktivacije nastaju potentni elektrofili koji mogu modifikovati DNA i potencijalno su genotoksični (Their i sar., 1996; Sherratt i sar., 1997). Upravo zbog toga, rezultati istraživanja dr Igora Plješa su u saglasnosti sa rezultatima Sgambata i saradnika (2002), koji su pokazali da se *GSTT1-nulti* genotip može dovesti u vezu sa smanjenim rizikom za nastanak karcinoma (Sgambato i sar., 2002). Do sada su opisana 2 SNP-a (eng. *single nucleotide polymorphism*) u okviru *GSTP1* gena, od kojih pažnju

istraživača više privlači prvi tip SNP-a (rs1695) koji u osnovi ima zamenu A (adenina) u G (guanin) na 313bp na kodonu 105 (*GSTP1 A1578G, Ile105Val*). To za posledicu ima zamenu amino kiseline izoleucina (Ile) valinom (Val) (Watson i sar., 1998), što može uticati kako na katalitičku, tako i na nekatalitičku aktivnost ovog enzima (Watson i sar., 1998; Thévenin i sar., 2011). Naime, svojim nekatalitičkom aktivnošću, GSTP1 značajnu učestvuje u regulaciji signalnih puteva uključenih u proces apoptoze (Tew i sar., 2011). Pokazano je da prisustvo specifičnih genskih varijanti GSTP1 može uticati na stepen interakcije između GSTP1 i c-Jun N-terminalne kinaze (JNK), proapoptotskog člana signalne kaskade mitogenom-aktiviranih protein kinaza (MAPK). Na taj način, zamena aminokiseline izoleucina (Ile) valinom (Val) na poziciji 105, može modifikovati GSTP1-posredovan inhibitorni efekat aktivnosti JNK. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali povećanu podložnost za karcinom jajnika kod žena nosilaca *GSTP1*Ile* (referentnog) alela, dok je pokazan šestostruko povećan rizik od karcinoma jajnika kod žena nosilaca kombinacije “rizičnih” genotipova (*GSTT1-aktivni/GSTP1*Ile*), što veoma verovatno ukazuje na sinergistički efekat ovih genotipova u procesu kancerogeneze kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika. Uloga polimorfizma GSTA1 u proceni rizika za obolevanje od karcinoma jajnika je po prvi put ispitivana u doktorskoj disertaciji dr Igora Plješa. Ovaj polimorfizam je predstavljen sa tri povezana polimorfizma pojedinačnih nukleotida, koji za posledicu imaju različitu ekspresiju sa smanjenom transkripcionom aktivnošću varijante *GSTA1*B* u odnosu na uobičajeni *GSTA1*A* alel (McIlwain i sar., 2006). Mada dobijeni rezultati nisu pokazali značajnu individualnu povezanost polimorfne ekspresije GSTA1 sa rizikom za obolevanje od karcinoma jajnika, iznenađujuće, u kombinaciji sa drugim “rizičnim” GST genotipovima (*GSTT1-aktivni, GSTP1-referentni* i *GSTA1-aktivni*), dobijena je kombinacija genotipova koja je bila prisutna kod čak 72% od svih pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su uključene u istraživanje. Štaviše, nosioci ove kombinacije su predstavljali više od 64 % od ukupnog broja ispitanica unutar bilo kog FIGO stadijuma, ukazujući na povećanu podložnost za hemijski-indukovanu kancerogenezu kod ovih osoba. Samim tim, može se pretpostaviti da varijantna ekspresija GST usled genetskog polimorfizma verovatno utiče na proces kancerogeneze u karcinomu jajnika i na taj način doprinosi individualnoj podložnosti za obolevanje od ovog karcinoma. Pored toga, interesantno je da kada je ispitivana individualna povezanost sa agresivnošću

bolesti, samo se učestalost *GSTA1* genotipova mogla dovesti u vezu sa FIGO stadijumom karcinoma jajnika ($p=0.047$). Kod *GSTO2* rs156697 polimorfizma jednog nukleotida promena nastaje u okviru egzona 4, na nukleotidu 424, gde adenin (A) biva zamenjen guaninom (G), što vodi supstituciji asparagina (Asn) aspartatom (Asp) u aminokiselini 142 (*N142D). Genotip A/A je prisutan u oko 59% populacije, A/G u oko 37%, a G/G u oko 4% populacije (Marahatta i sar., 2006). Do sada je udruženost ovog polimorfizma sa rizikom za nastanak karcinoma jajnika određivana u svega nekoliko studija, ali sa nekonzistentnim rezultatima. U ovom istraživanju, bolesnice nosioci *GSTO2**G/G varijantnog genotipa bile su pod 2,44 puta većim rizikom za nastanak ovog karcinoma u poređenju sa nosiocima referentnog genotipa, iako dobijeni rezultati nisu bili statistički značajni. Šta više, žene sa pozitivnom porodičnom anamnezom karcinoma, koje su nosioci *GSTO2*-varijantnog genotipa su bile pod 5,16 puta većim rizikom za obolevanje od karcinoma jajnika. Rezultati ove doktorske disertacije su u saglasnosti sa rezultatima Pogstaporna i saradnika koji su pokazali da su žene nosioci G alela u 1,73 puta povećanom riziku za obolevanje od carcinoma jajnika (Pongstaporn i sar., 2006). S obzirom na važnu antioksidatnu ulogu *GSTO2*-2, izmenjena aktivnost ovog enzima bi mogla dovesti do interindividulanih razlika prilikom detoksikacije slobodnih radikala prisutnih u duvanskom dimu, kao i profesionalne izloženosti kancerogenima.

Nezavisno od uticaja koji može imati na podložnost za obolevanje od karcinoma jajnika, važno je napomenuti da polimorfna ekspresija glutation S-transferaza može uticati kako na prognozu, tako i na efikasnost primenjene hemioterapije kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika. Naime, Khrunin i saradnici (2010) su pokazali da je *GSTP1***Ile105Val* polimorfizam značajno povezan sa preživljavanjem (eng. *progression-free survival*) (Khrunin i sar., 2010). U istraživanju dr Igora Plješa, pokazano je da prisustvo *GSTP1***ValVal* genotipa značajno utiče na preživljavanje pacijentkinja sa karcinomom jajnika. Naime, pacijentkinje nosioci ovog genotipa su imale značajno kraće preživljavanje u toku perioda praćenja od 36 meseci, što je u skladu sa rezultatima drugih studija (Howelles i sar., 2004; Khrunin i sar., 2010). Moguće objašnjenje kraćeg preživljavanja kod pacijentkinja koje su nosioci *GSTP1* *ValVal* genotipa jeste činjenica da kao posledica većeg stepena interakcije sa JNK, ova genska varijanta može imati izraženiji antiapoptotski efekat, dalje utičući na progresiju bolesti (Thevenin i sar., 2011). Pored toga, većina pacijentkinja sa karcinomom jajnika uključenih u

ovo istraživanje, nosilaca *GSTT1-aktivnog*, kao i *GSTO2*G/G* varijantnog genotipa je preminula u toku trogodišnjeg praćenja. Jedno od potencijalnih objašnjenja prognostičkog značaja ovih polimorfizama, pored već navedenih uloga u apoptotskim procesima, antioksidantnoj odbrani i regulaciji redoks ravnoteže, nalaze se u rezultatima posednjih istraživanja, koji pružaju dodatnu potporu ulozi zapaljenskog procesa u ovom tumoru.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Pljesa I, Berisavac M, Simic T, Pekmezovic T, Coric V, Suvakov S, Stamatovic Lj, Matic M, Gutic B, Milenkovic S, Pljesa-Ercegovac M and Savic-Radojevic A. Polymorphic expression of glutathione transferases A1, M1, P1 and T1 in epithelial ovarian cancer: Serbian case-control study. J BUON 2016; *in press* (M23, IF: 0,741)

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uloga glutathion transferaza kao biomarkera rizika za nastanak karcinoma jajnika” kandidata mr sci. med dr Igora Plješa predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uloge glutathion transferaza u nastanku i progresiji karcinoma jajnika. Prikazani rezultati ukazuju na to da polimorfizam glutathion transferaza može imati značajnu ulogu kako u proceni rizika, tako i u preživljavanju pacijentkinja sa karcinomom jajnika. Rezultati ove doktorske disertacije bi, pored razjašnjavanja veze između polimorfizama glutathion transferaza i kancerogeneze tumora jajnika, mogli da ukažu i na nove moguće strategije u terapiji karcinoma jajnika kroz individualni pristup bolesnicama.

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 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 mr sci. med dr Igora Plješa i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 18.05.2016. godine

Članovi Komisije:

Prof. dr Tatjana Simić

Prof. dr Tatjana Pekmezović

Prof. dr Vladimir Bošković

Mentor:

Prof. dr Milica Berisavac

Komentor:

Prof. dr Ana Savić-Radojević
