

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На Х редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 06. 09. 2019. године, прихваћен је извештај ментора проф. др Снежане Б. Пајовић и проф. др Сенише Ђурашевића о урађеној докторској дисертацији Ивана Љ. Павловића - истраживача сарадника Института за нуклеарне науке „Винча” Универзитета у Београду, под насловом „Прогностички значај клиничко-патолошких и антиоксидативних параметара код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега” и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Снежана Б. Пајовић - научни саветник Института за нуклеарне науке „Винча” Универзитета у Београду и редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу, др Сениша Ђурашевић - ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Снежана Пејић - виши научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча” Универзитета у Београду, др Софија Глумац - доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду и др Небојша Јаснић - ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Предмет истраживања докторске дисертације Ивана Љ. Павловића је испитивање прогностичког значаја клиничко-патолошких и антиоксидативних параметара на исход болести код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега (енг. *renal cell carcinoma, RCC*) као и одређивање антиоксидативног статуса (АО) ткива бубрега оболелих испитаника. Докторска дисертација представља оригинално истраживање урађено у Лабораторији за молекуларну биологију и ендокринологију, Института за нуклеарне науке „Винча” Универзитета у Београду.

Докторска дисертација је написана на 181 страни и садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Садржај, Текст по поглављима (Увод, Циљеви, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци), Литературу, Биографију аутора и Прилоге (Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу). Дисертација садржи 44 слике, 14 табела и 336 наслова у поглављу Литература, који се адекватно наводе у тексту.

Анализа докторске дисертације:

Предмет докторске дисертације је праћење преживљавања пацијената оболелих од RCC у петогодишњем периоду како би се утврдио значај појединих клиничко-патолошких параметара (старост и пол пацијента, стадијум, градус, величина и хистолошки подтип тумора) на укупно преживљавање испитаника. Поред тога,

анализирани су молекулски параметри АО заштите у здравом и туморском ткиву бубрега са циљем да се утврди тренд промене АО статуса у малигном ткиву, као и веза АО статуса са клиничко-патолошким параметрима на основу којих се процењује степен малигнитета и просторне дистрибуције тумора. У овој докторској дисертацији је први пут испитан утицај параметара антиоксидативне заштите на укупно преживљавање пацијената са RCC са циљем утврђивања и дефинисања предикционих параметара на основу којих се може предвидети исход пацијената након третмана нефректомијом.

У поглављу **УВОД** кандидат даје приказ досадашњих сазнања из литературе која су непосредно везана за предмет докторске дисертације. У првом делу Увода је дефинисан појам тубуларни карцином бурега и описана је генерална клиничка слика овог обољења. Такође, набројани су главни фактори ризика и описна етиологија болести уз упоредни приказ трендова обољевања и смртности у Србији и земљама на пет континената. Даље, представљена је класификација RCC уз приказ главних одлика хистолошких подтипова. На крају првог дела Увода, представљена је сложена слика молекуларних и метаболичких процеса који су у основи ове болести. Други део Увода представља кратак осврт на значај оксидативног стреса у физиолошким и патофизиолошким процесима организама, док трећи део Увода приказује АО систем у коме су описани главни носиоци АО заштите код људи уз анализу досадашњих сазнања о вези између овог система и малигних болести. У четвртном делу Увода је описана улога Keap1/Nrf2 система у заштити ћелија од оксидативног и електрофилног стреса и веза овог молекуларног пута са малигним болестима.

У Поглављу **ЦИЉЕВИ** су јасно дефинисана три основна циља истраживања. Први циљ је анализа утицаја клиничко-патолошких параметара на преживљавање пацијената оболелих од RCC у оквиру кога је анализирана корелација између хистолошког подтипа тумора и осталих клиничко-патолошких параметара, веза између клиничко-патолошких параметара и ризика за смртни исход, као и предикциони потенцијал клиничко-патолошких параметара. Други циљ је одређивање АО статуса пацијената оболелих од RCC у оквиру кога је праћена функционална експресија гена за АО ензиме и транскрипциони фактор Nrf2 и његов инхибитор Keap1, као и анализа параметара оксидативног стреса и липидне пероксидације. Трећи циљ је испитивање улоге параметара АО статуса на укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC и анализа њиховог предикционог значаја за исход болести.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** кандидат је описао начин на који су прикупљени узорци ткива бубрега као и подаци о клиничко-патолошким одликама и статусу пацијената оболелих од RCC, што је одобрено од стране Етичке комисије Медицинског факултета Универзитета у Београду. Такође, ово поглавље садржи детаљан опис методолошких поступака који су коришћени у овом истраживању. За потребе ове студије су ретроспективно прикупљени клиничко-патолошки подаци 185 пацијената оболелих од RCC, док је од 95 пацијената узорковано туморско и здраво ткиво бубрега. Животни статус пацијената је праћен у периоду од пет година. Сви пацијенти су дали информисани пристанак да се њихови подаци и узорци користе за потребе ове студије. Детаљно су описане спектрофотометријске методе којима је мерена концентрација укупних протеина, глутатиона (GSH) и малондиалдехида (MDA), ниво прооксидативно-антиоксидативног баланса (PAB), активност АО ензима: бакар, цинк супероксид дисмутазе (CuZnSOD), манган супероксид дисмутазе (MnSOD), каталазе (CAT), глутатион пероксидазе (GPx), глутатион редуктазе (GR) и глутатион трансферазе (GST). Описан је поступак електрофорезе и имуноблот (Western blot) анализа, којима је извршено раздвајање и релативна квантификација протеина АО ензима (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx, GR, GST), транскрипционог фактора Nrf2 и његовог инхибитора Keap1 у узорцима туморског и здравог ткива бубрега. Описан је поступак изолације РНК и анализа

експресије гена *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPX*, *GR*, *GST*, *NRF2*, *KEAP1* који су нормализовани у односу на референтни ген за пептидилпролил изомеразу А (*PPIA*). За потребе анализе генске експресије коришћене су методе реверзне транскрипције ланчане реакције полимеразе (енг. *reverse transcription polymerase chain reaction*, *RT-PCR*) и ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енг. *real-time polymerase chain reaction*, *RTq-PCR*).

На крају поглавља, наведени су статистички тестови помоћу којих је урађена анализа добијених резултата.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** прегледно су представљени експериментални резултати у оквиру три одвојена одељка. У првом одељку су представљени резултати студије преживљавања пацијената оболелих од *RCC* у коме је приказан утицај клиничко-патолошких фактора на укупно преживљавање испитаника. Резултати су показали да старост пацијената, величина, градус и стадијум тумора утичу на укупно преживљавање пацијената. Пацијенти старији од 60 година су имали значајно ниже укупно преживљавање. Такође, пацијенти са туморима већим од 7 cm су имали нижу стопу преживљавања након петогодишњег периода праћења. Испитаници са туморима виших градуса (III-IV) и стадијума (3-4) су значајно краће живели након хируршког третмана примарног тумора. Старост пацијената, величина, градус и стадијум тумора су клиничко-патолошки параметри који независно једни од других утичу на исход болести. Међутим, мултифакторска анализа је извдојила само градус и стадијум тумора као факторе који значајно утичу на исход болести.

У другом одељку представљени су резултати биохемијских анализа (ниво *PAB*, концентрација *GSH* и *MDA*) и анализа функционалне експресије гена за АО ензиме која укључује ниво *iPINK*, релативну количину протеина и ензимску активност. Такође, представљени су резултати експресије гена за транскрипциони фактор *Nrf2* и његов инхибитор *Keap1*. Сви резултати у овом одељку су добијени мерењем датих параметара у туморском и здравом ткиву бубрега. Поред тога, поређени су резултати између тумора различитих градуса и стадијума чиме је дата посебна димензија овој анализи, јер је праћена промена АО статуса у вези са повећањем степена малигнитета и просторног ширења тумора бубрега. Резултати су показали да је туморско ткиво бубрега у стању оксидативног стреса које је повезано са просторним ширењем тумора. Повишен ниво *MDA* у туморима указује на пораст липидне пероксидације у малигно трансформисаном ткиву, док опадање концентрације *GSH* показује измењен редокс статус малигног ткива бубрега. У туморима, без обзира на градус и стадијум, забележена је смањена експресија *CuZnSOD*, док је експресија *MnSOD* била повишена у туморском ткиву, у поређењу са здравим ткивом. Каталаза је, независно од градуса и стадијума тумора, била снижена на транскрипционом и транслационом нивоу што је праћено значајно мањом активношћу овог ензима у поређењу са контролним ткивом. Варирање експресије *GPx* је забележено на нивоу транскрипције и огледа се у порасту релативног нивоа *iPINK* у туморском ткиву. Ова промена није утицала на ниво *GPx* протеина, који је остао непромењен, али је активност ензима била значајно нижа у туморима независно од градуса и стадијума. У туморском ткиву бубрега је забележена нижа експресија *GR*, независно од стадијума тумора. Исти тренд промене на транскрипционом и транслационом нивоу је забележен код виших градуса, док је активност *GR* била нижа независно од степена малигнитета. Резултати су показали нисходну регулацију *GSTA1* гена у туморском ткиву бубрега, што је резултирало падом нивоа протеина и значајним снижењем активности *GST*. Промена функционалне експресије *GST* није била у корелацији са градусом и стадијумом тумора. Туморско ткиво бубрега је показало стабилну експресију транскрипционог фактора *Nrf2* на коју није утицао ни пораст нивоа *Keap1* који је забележен код тумора високог градуса.

У трећем одељку анализиран је утицај активности АО ензима као и концентрације *GSH* и *MDA* на укупно преживљавање пацијената оболелих од *RCC* и процењен је њихов

прогностички значај. Резултати су показали да су пацијенти са повећаном концентрацијом GSH у туморском ткиву имали ниже укупно преживљавање након петогодишњег периода праћења. Такође, ниже укупно преживљавање је забележено код испитаника код којих је у туморима измерена већа активност GPx и GR. Анализа предикционог значаја АО параметара је показала да је повећана концентрација GSH, као и повећана активност GPx и GR у вези са готово два пута већим ризиком од смртног исхода након хируршког третмана.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** је дата упоредна анализа резултата ове докторске дисертације и података из литературе. У првом делу дискусије је дискутовано о вези између клиничко-патолошких одлика и укупног преживљавања пацијената као и о предикционом значају клиничко-патолошких параметара. Резултати тезе су дискутовани уз упоредну анализу најновијих резултата из сличних истраживања, чиме је дат свеобухватан преглед савремене литературе из ове области.

У другом делу дискутоване су промене оксидо-редукционог баланса ткива бубрега и њихова веза са процесом канцерогенезе. Такође, анализиран је однос између процеса липидне пероксидације и малигне трансформације ткива. Поред тога, детаљно је дискутовано о измењеном АО статусу туморског ткива бубрега са посебним освртом на унутарћелијску специфичност у погледу активности супероксид дисмутаза. На основу резултата је указано на улогу водоник пероксида у процесу малигне трансформације бубрега. Резултати су коментарисани и са аспекта метаболичких промена у малижном ткиву бубрега. Посебно је коментарисан однос између експресије GST и његовог регулатора Nrf2 са аспекта способности малигног ткива да елиминише ксенобиотику или терапеутику. Указано је на цитопротективну улогу транскрипционог фактора Nrf2 у туморском ткиву бубрега која делом проистиче из нарушене контроле од стране Keap1.

У трећем делу дискусије коментарисани су резултати о утицају АО параметара на укупно преживљавање пацијената. Указано је да је повећање концентрације GSH и активности глутатион зависних ензима (GPx и GR) у малижном ткиву бубрега у вези са лошијим исходом болести и повећаним ризиком од смртног исхода.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** сажето и јасно су представљени најважнији закључци који су у складу са постављеним циљевима, као и добијеним експерименталним резултатима у овој докторској дисертацији. Закључено је да с обзиром на мултифакторску основу карцинома бубрега, градус и стадијум тумора имају прогностички значај на основу кога се са великом сигурношћу може проценити исход болести након нефректомије. Даље, малигно ткиво бубрега је у стању оксидативног стреса који доприноси расту и просторном ширењу тумора. Оксидативни стрес је последица ниже концентрације GSH и смањене способности ензима АО одбране да елиминишу реактивне врсте кисеоника. На основу функционалне експресије MnSOD, закључено је да овај ензим доприноси АО заштити малигног ткива бубрега, док нижа активност CAT и GPx указује на значајну улогу водоник-пероксида у процесу канцерогенезе бубрега. Смањена активност GST је део раних догађаја значајних за етиопатогенезу тубуларног карцинома бубрега. Стабилна експресија Nrf2, указују да је очување функционалности овог транскрипционог фактора један од кључних догађаја у процесу канцерогенезе бубрега. Код испитаника са повишеним нивоом GSH, и повишеном активношћу GPx и GR у малижном ткиву бубрега забележен је два пута већи ризик од смртног исхода што указује да ови параметри (GSH, GPx и GR) могу имати предикциони значај код оболелих од тубуларног карцинома бубрега.

На крају докторске дисертације се налази поглавље **ЛИТЕРАТУРА** у коме је дата листа од 336 библиографских јединица које су од значаја за предмет истраживања ове докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Pavlović I**, Pejić S, Radojević-Škodrić S, Todorović A, Stojiljković V, Gavrilović L, Popović N, Basta-Jovanović G, Džamić Z, Pajović SB. The effect of antioxidant status on overall survival in renal cell carcinoma. Archives of Medical Science 2019; DOI: 10.5114/aoms.2019.86818.
<https://www.termedia.pl/The-effect-of-antioxidant-status-on-overall-survival-in-renal-cell-carcinoma,19,37279,1,1.html> **M21**
2. **Pavlović I**, Pejić S, Glumac S, Todorović A, Stojiljković V, Popović N, Gavrilović L, Pajović SB, Radojević-Škodrić S, Džamić Z, Basta-Jovanović G. Clinicopathological characteristics and survival in renal cell carcinoma: a retrospective analysis of patients in Serbia. Journal of BUON 2017;22(6):1434-1440. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29332335> **M23**

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Pavlović I**, Todorović A, Stojiljković V, Gavrilović L, Popović N, Pajović SB, Pejić S. Antioxidant capacity of the kidney tissue in patients with renal cell carcinoma. RAD Conference Proceedings, vol 1, pp. 153-155, 2016, DOI: 10.21175/RadProc.2016.36. **M33**
2. **Pavlović I**, Todorović A, Gavrilović L, Popović N, Pajović S, Stojiljković V, Pejić S. Upregulated Nrf2 maintains the detoxifying capacity of highgrade renal cell carcinoma. FEBS Advanced Lecture Course: Redox-omic Technologies and their Application in Health and Disease. 17-23 September 2018, Spetses Island, Greece, poster No. 1. **M34**
3. **Pavlović I**, Todorović A, Gavrilović L, Stojiljković V, Popović N, Pajović SB, Basta-Jovanović G, Džamić Z, Radojević-Škodrić S, Pejić S. Renal cell carcinoma: Clinicopathologic characteristics and evaluation of prognosis. Summer School GENOMIC MEDICINE, Bridging research and the clinic. 3-7 May 2016, Portorož, Slovenia, p. 83. **M34**
4. **Pavlović I**, Todorović A, Stojiljković V, Gavrilović L, Popović N, Pajović SB, Pejić S. The antioxidant capacity of the kidney tissue in patients with renal cell carcinoma. 4th International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research. 23-27 May 2016, Niš, Serbia, p. 35. **M34**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

Мишљење и предлог Комисије:

На основу наведеног у овом Извештају, Комисија сматра да резултати докторске дисертације кандидата Ивана Љ. Павловића представљају оригинални и значајан научни допринос бољем познавању клиничко-патолошких фактора и молекулских механизма који су у вези са преживљавањем пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. Истраживачки поступак докторске дисертације је прецизно планиран, примењене су адекватне истраживачке методе, као и статистички поступци за обраду добијених резултата. Резултати су свеобухватно и критички дискутовани и на основу њих су изведени одговарајући закључци. Остварени резултати су публиковани у виду две оригиналне међународне научне публикације што указује на њихову значајност и актуелност. Текст докторске дисертације је прошао проверу оригиналности.

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Ивана Љ. Павловића под насловом: „Прогностички значај клиничко-патолошких и антиоксидативних параметара код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега”.

У Београду, 09.09. 2019. године

КОМИСИЈА:

др Снежана Б. Пајовић, научни саветник,
Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча”;
Редовни професор, Универзитет у Нишу – Медицински факултет

др Синиша Ђурашевић, ванредни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Снежана Пејић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча”;

др Софија Глумац, доцент,
Универзитет у Београду – Медицински факултет

др Небојша Јаснић, ванредни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет