

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU**

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 05.06.2024. godine, 19/XXVI-1/3-MД, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„POVEZANOST POLIMORFIZAMA *GLI-1*, *PTCHI* I *SMO* GENA
HEDGEHOG SIGNALNOG PUTA SA RIZIKOM OBOLJEVANJA, KLINIČKO
PATOLOŠKIM FAKTORIMA I PROGNOZOM MELANOMA“**

kandidata dr Marije Dunjić, zaposlene u u firmi „Guard Plus“ u Beogradu kao medicinski saradnik. Mentor 1 je Doc. dr Dijana Perović, mentor 2 je prof. dr Gordana Šupić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Sanja Mazić, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Dušan Škiljević, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Biljana Ljujić, profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

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 dr Marije Dunjić napisana je na ukupno 85 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 19 tabela i 19 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je definisano šta je to melanom, dat je pregled istorijata, epidemiologije i etiologije ove bolesti. Detaljno je obrađena genetička osnova patogeneze melanoma, od somatskih mutacija u genima koji kodiraju važne ćelijske signalne puteve, preko nasledne predispozicije, mutacija „UV potpisa“ i genetičke heterogenosti tumora. Navedena je detaljna klasifikacija melanoma, kao i postupci dijagnostike i stadiranja bolesti. Na adekvatan način opisani su modaliteti lečenja, od hirurškog lečenja, preko ciljane i imunoterapije melanoma.

Takođe, opisana je uloga *Hedgehog* signalnog puta, kako u fiziološkim, tako i u patološkim procesima kod čoveka. Dat je pregled ključnih gena i molekula u ovoj signalnoj kaskadi, kao i kako aberantna aktivacija ovog puta učestvuje u malignoj transformaciji, sposobnosti invazije i metastaziranja u različitim malignitetima.

Definisana je pojam polimorfizma pojedinačnog nukleotida i kako ove genetičke varijacije mogu biti povezane sa predispozicijom za razvoj kompleksnih bolesti poput maligniteta, uticati na njihov tok i ishod.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja učestalost genotipova polimorfizama gena *PTCHI* (rs357564), *SMO* (rs2228617) i *GLII* (rs2228224, rs2228226) u grupi od 93 bolesnika sa melanomom i kontrolnoj grupi od 97 zdravih osoba, odgovarajuće polne i starosne distribucije; određivanja povezanosti ispitivanih polimorfizama sa predispozicijom za oboljevanje od melanoma, poređenjem učestalosti genotipova između grupe bolesnika sa melanomom i kontrolne grupe zdravih ispitanika; određivanja povezanosti ispitivanih polimorfizama sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama obolelih od melanoma; kao i određivanja povezanosti ispitivanih polimorfizama sa prognozom bolesti kod obolelih od melanoma, ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez recidiva bolesti.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o retrospektivnoj kohortnoj studiji sa periodom praćenja preživljavanja bez bolesti i ukupnog preživljavanja od minimum 3 godine. Studija je urađena u okviru projekta MFVMA 03/23-25 (Odobrenje #6/4/2023 Etičkog Odbora Medicinskog fakulteta VMA, Univerziteta odbrane u Beogradu) u saradnji sa Institutom za Humanu genetiku MFUB (Etičko Odobrenje Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu broj 17/XII-3 od 14.12.2023.). Sve procedure sprovedene u studijama koje su uključivale humane subjekte bile su u skladu sa etičkim standardima institucionalnog i/ili nacionalnog istraživačkog komiteta i sa Helsinškom deklaracijom iz 1964. godine i njenim kasnijim izmenama ili uporedivim etičkim standardima. Informisani pristanak je dobijen od svih pojedinačnih učesnika uključenih u studiju. Jasno su dati kriterijumi za uključenje u studiju, kao i kriterijumi za isključenje iz studije. Adekvatno su opisani dijagnostički postupci na osnovu kojih su dobijeni kliničko-patološki podaci u grupi obolelih, kao i TNM sistem klasifikacije na osnovu koga su određeni klinički i patološki stadijumi bolesti.

Detaljno su opisane genetičke analize kojima su iz periferne krvi ispitanika određeni polimorfizmi tri ključna gena *Hedgehog* signalnog puta. Objašnjen je način odabira varijanti unutar gena *PTCHI* (rs357564), *SMO* (rs2228617) i *GLII* (rs2228224, rs2228226) i detaljno

opisan komercijalni esej TaqMan® SNP (Applied Biosystems, USA) kojim je izvršena genotipizacija. Prisustvo određene genetičke varijante detektovano je metodom alelske diskriminacije pomoću Real-Time PCR 7500 (Applied Biosystems, USA), a dobijeni rezultati analizirani su SDS softverom (v.2.3).

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 302 reference.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Korišćenjem programa iThenticate izvršena je provera originalnosti doktorske disertacije Marije M. Dunjić. Izveštaj je pokazao indeks podudarnosti od 9%. Uvidom u izveštaj utvrđena su podudaranja sa 74 primarna izvora. Podudaranje sa jednim izvorom je iznosilo 2% i radi se o originalnom naučno-istraživačkom radu koji je kandidatkinja objavila na osnovu rezultata svoje doktorske disertacije, tri izvora su imala podudaranje od 1%, dok je za sve ostale izvore podudaranje bilo manje od 1%. Podudaranje se najvećim delom odnosilo na standardno prisutne delove doktorskih disertacija (uobičajeni genetički pojmovi, opis primenjene metodologije, navođenje citata, uobičajenih skraćenica, stručnih termina, opštih fraza, institucija, bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi). Uvidom u izveštaj potvrđena je originalnost rezultata kandidata. Kada se sve izneto uzme u obzir, izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije Marije M. Dunjić.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Kod 93 bolesnika sa melanomom i 97 zdravih ispitanika iz kontrolne grupe određena je distribucija genotipova za polimorfizme *PTCH1* (rs357564), *SMO* (rs2228617) i *GLII* (rs2228224, rs2228226). Poređenjem učestalosti genotipova ispitivanih polimorfizama između grupe bolesnika sa melanomom i kontrolne grupe zdravih ispitanika, određena je njihova povezanost sa predispozicijom za oboljevanje od melanoma. Analizom odnosa šansi (engl. *Odds ratio*, OR), prilagođenom za pol i starost, dobijeni su rezultati koji ukazuju da su *GLII* polimorfizmi rs2228224 i rs2228226 povezani sa predispozicijom za oboljevanje od melanoma. Pokazano je da nosioci mutiranog G alela polimorfizma *GLII* rs2228224

(kombinovani GA+GG genotipovi) imaju značajno veći rizik od pojave melanoma u poređenju sa izvornim (engl. *wild type*) AA genotipom, OR=2,261 (95% CI: 1,251-4,087), p=0,007. Povećan rizik za nastanak melanoma je takođe primećen i za polimorfizam *GLII* rs2228226 kod nosilaca mutiranog C alela (kombinovani CG+CC genotipovi), u poređenju sa izvornim GG genotipom, OR= 2,176 (95% CI: 1,207-3,921), p=0,010. U analizi predispozicije za melanom za druge ispitivane polimorfizame *SMO* (rs2228617) i *PTCHI* (rs357564), poređenjem učestalosti genotipova ovih polimorfizama između grupe bolesnika sa melanomom i kontrolne grupe zdravih ispitanika nije uočena statistički značajna povezanost.

Analizom odnosa polimorfizama *GLII* (rs2228224, rs2228226), *SMO* (rs2228617) i *PTCHI* (rs357564) sa demografskim karakteristikama (starost i pol pacijenata) u grupi obolelih od melanoma, primećena je značajno veća prevalencija varijante A alela polimorfizma *GLII* rs2228224 kod muških ispitanika u kohorti bolesnika sa melanomom (p=0,025). Međutim, nije uočena statistički značajna povezanost između drugih analiziranih polimorfizama i demografskih karakteristika pacijenata. Analizom odnosa ispitivanih polimorfizama sa kliničko-patološkim karakteristikama (lokalizacija tumora, klinički stadijumi bolesti, veličina tumora, status limfnih čvorova, progresija bolesti i patohistološke karakteristike-debljina tumora po Breslou, ulceracija, broj mitozna i TIL) u grupi obolelih od melanoma, nije uočena statistički značajna povezanost.

Analiziran je odnos polimorfizama *GLII* (rs2228224, rs2228226), *SMO* (rs2228617) i *PTCHI* (rs357564) sa prognozom bolesti kod obolelih od melanoma. Krive ukupnog preživljavanja (engl. *Overall survival*, OS) i preživljavanja bez recidiva bolesti (engl. *Relapse-free survival*, RFS) su procenjene korišćenjem Kaplan-Meier analize, upoređene sa log-rank testom. Pokazano je da varijantni mutirani genotip CC polimorfizma *GLII* rs2228226 ima lošije ukupno preživljavanje i preživljavanje bez recidiva bolesti u poređenju sa izvornim (wt) genotipom. (p=0.0001 i p=0.037, redom). Kod drugih ispitivanih genetičkih polimorfizama, *GLII* (rs2228224), *SMO* (rs2228617) i *PTCHI* (rs357564), u grupi obolelih od melanoma, nije uočena značajna statistička razlika u ukupnom preživljavanju i preživljavanju bez recidiva.

Univarijatna analiza bazirana na Cox-ovoj regresionoj analizi je pokazala da su progresija bolesti (HR=13,420 [1,820-17,482], p=0,0001) i genski polimorfizam *GLII* rs2228226 (HR=5,640 [1,820-17,482], p=0,003) visoko povezani sa rizikom od lošijeg ukupnog

preživljavanja kod pacijenata sa melanomom. Promenljive koje su pokazale statističku značajnost u univarijantnoj analizi, uključujući one sa nivoom značajnosti ispod 20%, analizirane su zatim zajedno u multivarijantnoj Cox-ovoj analizi odnosa rizika (engl. *Cox Proportional Hazards Regression analysis*). Multivarijantna analiza je pokazala da progresija bolesti (HR=14,434 [3,296-63,216], p=0,0001) i genetički polimorfizam *GLII* rs2228226 (HR=4,161 [1,510-11,468], p=0,006) ostaju nezavisni prognostički faktori kod pacijenata sa melanomom.

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Dosadašnja istraživanja su ukazala da je povećana aktivnost *GLII*, kao i drugih ključnih gena u *Hedgehog* signalnom putu, povezana s malignom transformacijom, invazivnošću i sposobnošću metastaziranja u različitim malignitetima, uključujući melanom (Zhu i sar., 2010). Osim toga, prethodne studije su pokazale da varijante ovih gena mogu biti povezane s inflamatornim odgovorom i neoplastičnom transformacijom (Yadav i sar, 2016, Li i sar, 2014, Rodriguez-Acevedo, 2022). Međutim, prema dostupnoj literaturi, do ovog istraživanja nije ispitivana njihova uloga u melanomu. Dalje, sve više istraživanja govori u prilog tome da su predispozicija za melanom, tok i ishod bolesti, povezani sa genetičkim varijantama po tipu polimorfizma pojedinačnog nukleotida- SNP (Wang i sar., 2023, Hou i sar., 2015, Rendleman i sar., 2013). U ovom istraživanju polimorfizmi *GLII* rs2228226 i *GLII* rs2228224 su identifikovani kao značajni biomarkeri predispozicije za nastanak melanoma, a polimorfizam *GLII* rs2228226 kao značajan marker loše prognoze kod pacijenata sa melanomom.

Već je pokazano da polimorfizmi *GLII* potencijalno mogu da utiču na vitalnost, rast, proliferaciju i preživljavanje ćelija (Hou i sar, 2015), kao i na ćelijsku migraciju i invaziju (Guo i sar., 2021, Xu i sar., 2020, Xu i sar, 2021), što bi mogli da budu mehanizmi koji stoje u osnovi značajne povezanosti polimorfizama *GLII* sa napredovanjem melanoma zapažene u ovom istraživanju. Sem ovoga, nesinonimna varijanta *GLII* gena po tipu SNP rs2228226 (G>C, p. Q1100E) smeštena na dugom kraku hromozoma 12 u regionu 12q13.3, dovodi do zamene aminokiselina glutamina sa glutaminskom kiselinom u proteinu *GLII*. Usled toga, u proteinu *GLII* dolazi promene naelektrisanja u evolutivno očuvanom regionu blizu prepoznatog domena za transaktivaciju, promene strukture transaktivacijskog domena, smanjenja stabilnosti proteina i njegove sposobnosti za aktivaciju. Procenjeno je da je sposobnost varijante *GLII* Q1100E da aktivira *GLII* zavisnu transkripciju gena smanjena za

50% u poređenju sa izvornom alelskom varijantom *GLI1* (engl. wild type) u *in vitro* uslovima. Kako transkripcioni faktor *GLI1* predstavlja jednu od ključnih komponenti *Hedgehog* signalnog puta, koji igra važnu ulogu u inflamaciji i karcinogenezi, do sad je pokazana povezanost alelske varijante *GLI1* rs2228226 koja kodira protein smanjenje aktivnosti sa brojnim inflamatornim i malignim bolestima (Huntzicker i sar., 2006, Lees i sar., 2008), što je u skladu sa rezultatima ove studije u kojoj je pokazana njena povezanost sa nastankom i napredovanjem melanoma.

U studiji koja je uključila oko 5000 ispitanika engleske, škotske i švedske populacije ispitana je varijabilnost *GLII* gena kod pacijenata sa inflamatornim bolestima creva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD) i sugerisano je da smanjena aktivnost *GLI1* proteina koja se dešava u varijanti *GLII* rs2228226 može biti jedan od okidača za IBD. Tako je ovaj SNP predložen kao faktor rizika za ove bolesti, gde je pokazana značajna asocijacija sa ulceroznim kolitisom, kao i granična asocijacija sa Kronovom bolešću. U animalnom modelu u kojem je dekstran natrijum sulfatom (DSS) provocirana akutna upala creva, miševi koji su bili nosioci varijantnog alela polimorfizma *GLII* rs2228226 razvili su tešku inflamaciju creva i imali značajno povećanu ekspresiju proinflamatornih i prokancerogenih citokina IL-23 i IL-17 (Lees i sar., 2008). Prethodno je pokazano da IL-23/IL-17/IL-6/STAT3 osovina igra ključnu ulogu u modulaciji tumorske mikrookoline i promovisanju rasta tumora u animalnim modelima melanoma (Kortylewski i sar., 2009, Tang i sar., 2013). Svi ovi nalazi ukazuju na sinergijsku interakciju putanja HH/GLI-1 i IL-23/IL-17/IL-6/STAT3 u razvoju i napredovanju melanoma. Nakon ovih istraživanja, alelska varijanta *GLII* rs2228226 pokazala se i kao nezavisni prognostički marker loše prognoze kod pacijenata u II i III stadijumu kolorektalnog karcinoma, gde je utvrđeno da je genotip varijante *GLII* rs2228226 CC povezan s smanjenim vremenom do pojave recidiva tumora (Szkandera i sar., 2014). U skladu sa rezultatima ove doktorske teze gde je pokazana povezanost *GLII* rs2228226 polimorfizma sa nastankom melanoma i lošijom prognozom, prethodno je utvrđena njegova veza i sa predispozicijom za oboljevanje od karcinoma žučne kese, kao i lošijim preživljavanjem kod pacijenata u uznapredovalom stadijumu ove bolesti (Yadav i sar., 2016). Takođe, nađeno da je jedan genotip ovog polimorfizma povezan i sa većim rizikom za razvoj hronične limfocitne leukemije (Li i sar., 2014).

Do sada su genske varijante *PTCH*, koji se smatra tumor supresorom i deo je HH signalne putanje, povezivane sa više maligniteta, a najviše sa bazocelularnim karcinomom (Zhang i sar., 2011, Begnini i sar., 2010). Nedavno je sprovedena studija, koja je obuhvatila ispitanike

meksičke populacije, u kojoj je ispitivana povezanost polimorfizama gena *PTCH1* rs357564, rs2297086, rs2236405 i rs41313327 sa predispozicijom za razvoj bazocelularnog karcinoma. U skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije u kojoj nije pronađena značajna povezanost između ispitivanog polimorfizma gena *PTCH1* rs357564 i predispozicije za razvoj melanoma, ni u ovoj studiji nije pronađena značajna povezanost polimorfizama *PTCH1* gena sa predispozicijom za razvoj bazocelularnog karcinoma (Zambrano-Roman i sar, 2024).

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Dunjic M, Lukic N, Djordjevic B, Uzelac B, Ostojic N, Supic G. GLI-1 polymorphisms of Hedgehog pathway as novel risk and prognostic biomarkers in melanoma patients. *Melanoma Res.* 2022 Feb 1;32(1):11–7. doi: 10.1097/CMR.0000000000000789. (M22, IF 2.2)

Dunjić M, Perović D, Šupić G. Genetičke promene u melanomu. *Medicinski podmladak.* Vol. 76 Br. 1 (2025) DOI: 10.5937/mp76-48374

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Povezanost polimorfizama *GLI-1*, *PTCH1* i *SMO* gena *Hedgehog* signalnog puta sa rizikom oboljevanja, kliničko patološkim faktorima i prognozom melanoma" dr Marije Dunjić, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uloge polimorfizama ključnih gena *Hedgehog* signalnog puta u nastanku, napredovanju i metastaziranju melanoma. U ovom istraživanju polimorfizmi *GLII* rs2228226 i *GLII* rs2228224 su identifikovani kao novi biomarkeri predispozicije za nastanak melanoma, a polimorfizam *GLII* rs2228226 kao prognostički marker lošeg ishoda, uključujući i lošije ukupno preživljavanje i preživljavanje bez recidiva bolesti. Da bi *GLII* polimorfizmi mogli da se široko prihvate i klinički primene kao biomarkeri predispozicije i prognoze za melanom, neophodno je da se ovi rezultati potvrde na većem broju ispitanika i u različitim populacionim grupama. Rezultati ovog istraživanja bi se mogli reflektovati i na lečenje melanoma. U toku su istraživanja koja ispituju mogućnosti lečenja ovog maligniteta lekovima usmerenim na SHH-PTCH1-SMO/GLII signalnu kaskadu, sa fokusom na GLII koji je ključni modulator HH signalizacije. Različite genetičke varijante koje kodiraju ovaj transkripcioni faktor mogu biti polazna osnova za kreiranje personalizovanih lekova, o kojima se sve više govori i kojima se sve više teži. Za definisanje personalizovanog terapijskog pristupa, sugerisano je da bi buduća klinička istraživanja trebalo bi da razmotre farmakogenetičko testiranje gena *Hedgehog* putanje, a posebno *GLII* gena.

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 dr Marije Dunjić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 24.06.2024.

Članovi Komisije:

Prof. dr Sanja Mazić

Prof. dr Dušan Škiljević

Prof. dr Biljana Ljujić

Mentor 1:

Doc. dr Dijana Perović

Mentor 2:

Prof. dr Gordana Šupić
