

ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ НАУЧНЕ ЗАСНОВАНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изборном већу Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу бр 01-8423/3-2 од 02.12.2009. године именована је комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Др Жељка Мијушковића под насловом:

„Одређивање полиморфизма гена за глутатион С-трансферазу и интерлеукин-10 и мутација *PTCH* гена код пацијената с базоцелуларним карциномом“.

На основу поднете документације, комисија доноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Биографски подаци кандидата

Др Жељко Мијушковић је рођен 18.12.1969. године у Београду. Медицински факултет Универзитета у Београду завршио је 1995. године с просечном оценом 9,27 и оценом на дипломском испиту 10. Специјализацију из дерматовенерологије завршио је с одличним успехом 1999. године у Клиници за кожне и полне болести Војномедицинске академије. Од 1999. године запослен је у Клиници за кожне и полне болести ВМА, а од 2007. године је на месту начелника Лабораторије за имунодерматологију Клинике за кожне и полне болести ВМА. Члан је дерматовенеролошке секције СЛД, Удружења дерматовенеролога Србије, Европске академије за дерматологију и венерологију, Европског удружења за истраживачку дерматологију, Интернационалног удружења дерматолога и члан председништва извршног одбора СЛД. До сада је био аутор и коаутор 4 рада у иностраним часописима, 2 рада у домаћим часописима, 9 поглавља у домаћим књигама, 6 поглавља у иностраним књигама, 13 радова у целини у зборницима радова с домаћих конгреса и 34 саопштења на домаћим и иностраним конгресима.

Одабране референце:

Радови у иностраним часописима

1. Pavlović MD, Karadaglić ĐM, Kandolf LO, **Mijušković ŽP**. Persistent erythema multiforme: a report of three cases. J Eur Acad Dermatol Venereol 2001; 15: 54–8. **M22**
2. **Mijusković ZP**, Zecevic RD, Pavlovic MD. Pyoderma gangrenosum with spleen involvement and monoclonal IgA gammopathy. J Eur Acad Dermatol Venereol 2004; 18: 697–9. **M22**
3. Kandolf-Sekulovic L, Pavlovic MD, Glisic B, Petronijevic M, Ristic G, **Mijuskovic Z**, Zecevic RD, Stefanovic D. Adamantiades–Behçet’s disease, deep venous thrombosis and anticardiolipin antibodies: report of two cases. J Eur Acad Dermatol Venereol 2005; 19: 484–6. **M22**
4. Pavlović MD, **Mijušković ŽP**, Soyer HP. Naevus en cocarde (hoop-loop naevus). J Eur Acad Dermatol Venereol 2007; 21: 689–91. **M22**

Радови у домаћим часописима

1. **Mijušković ŽP**, Zečević RD, Karadaglić ĐM, Bursać PL. *Chilblain lupus erythematosus* («*Lupus pernio*»). Acta Dermatovenerol Iugosl 1997; 20: 49–53. **M53**
2. Ristić B, **Mijušković ŽP**, Zečević RD. Kutani nekrotizujući vaskulitis – terapijski izazov. Balneoclimatologia 2000; 24: 93–5. **M51**

2. Предмет истраживања

Дистрибуција и учесталост полиморфизама гена за *GST* и *IL-10* код пацијената с базоцелуларним карциномом. Детекција и учесталост мутације гена за *PTCH* код пацијената с базоцелуларним карциномом. Анализа утицаја клиничких и демографских карактеристика пацијената на настанак базоцелуларног карцинома и њихова повезаност с полиморфизмима за *GST* и *IL-10* и мутацијама *PTCH*.

3. Циљеви истраживања

Одредити демографске и клиничке карактеристике пацијената.

Утврдити да ли постоји повезаност полиморфизама гена за *GST* с клиничким и демографским карактеристикама пацијената.

Утврдити да ли постоји повезаност полиморфизама гена за *IL-10* (локуси -1082, -819 и -592) с клиничким и демографским карактеристикама пацијената.

Утврдити да ли постоји повезаност мутација гена за *PTCH* с клиничким и демографским карактеристикама пацијената.

4. Задаци истраживања

Испитати учесталост генотипова гена за *GST* код пацијената с базоцелуларним карциномом.

Испитати учесталост генотипова гена за *IL-10* (локуси -1082, -819 и -592) код пацијената с базоцелуларним карциномом.

Испитати учесталост мутације гена за *PTCH* у туморском ткиву пацијената са базоцелуларним карциномом.

5. Испитаници и методологија истраживања

Испитаници су пацијенти с базоцелуларним карциномом (БК), изузимајући пацијенте с Горлиновим синдромом и *xeroderma pigmentosum*. Биће анализирани следећи клинички параметри: анамнеза о ранијим туморима коже, време настанка БК, фототип коже пацијента (према *Fitzpatrick*-овој скали), континуирано и интермитентно излагање УВ зрацима током живота, локализација тумора, број тумора, постојање рецидива БК и присуство мултиплих тумора. Све лезије суспектне на БК, приликом клиничког и дермоскопског прегледа, биће уклоњене хируршком ексцизијом и затим ће бити послате на патохистолошки преглед. Свим пацијентима биће узето по 5 ml крви у епрувети с антикоагулансом.

Изоловање ДНК: ДНК ће бити изолована из периферне крви и туморског ткива, које претходно смрзнуто у течном азоту, методом исољавања у хипертоничном раствору натријум-хлорида. Квалитет изоловане ДНК ће бити провераван електрофорезом на 1% агарозном гелу (бојеном етидијум-бромидом), а концентрација ДНК биће одређивана помоћу спектрофотометра (*GeneQuant*, *Pharmacia LKB*, Шведска).

За одређивање *IL-10* и *GST* генотипова користиће се ДНК изолована из периферне крви док ће се присуство мутација у *PTCH* гену анализирати на ДНК изолованој из туморског ткива.

Одређивање *IL-10* генотипова за позиције -1082 и -819/592: *IL-10*-1082 и -819/592 генотипови одређиваће се *PCR-ARMS* (енгл. *polymerase chain reaction-amplification refractory mutation system*) методом. Продукти *PCR* амплификације биће анализирани на 2% агарозном гелу после електрофорезе и бојења етидијум-бромидом.

Одређивање генотипа за *GSTT1*, *GSTP1* и *GSTM1*: Анализа *GSTT1* генотипа засниваће се на *PCR* амплификацији. У истој реакционој смеши користиће се прајмери за умножавање *GSTT1* региона као и прајмери за β -актин. Продукти *PCR* амплификације биће анализирани на 2% агарозном гелу после електрофорезе и бојења

етидијум-бромидом. Део *GSTP1* региона ће бити умножен *PCR* методом, а потом ће амплификати бити инкубирани с *BsmAI* рестрикционом ендонуклеазом. Продукти дигестије биће анализирани на 10% полиакриламидном гелу после електрофорезе и бојења сребро- нитратом. Делови гена за *GSTM1* и β -актин биће умножени *PCR* методом. Продукти *PCR* амплификације биће анализирани на 2% агарозном гелу после електрофорезе и бојења етидијум-бромидом.

Детекција мутација у *PTCH* гену: *PCR* методом биће умножено шест егзона *PTCH* гена (A3, A6, A8, A13, A15 и A16). Успешност амплификације биће проверавана електрофорезом на 2% агарозном гелу (бојеном етидијум-бромидом). Присуство мутација у наведеним егзонима биће анализирано на 10% и 8% полиакриламидним геловима после *SSCP* електрофорезе и бојења сребро-нитратом.

Статистичка обрада података: Добијени подаци о полиморфизмима гена за *GST* (*M*, *T* и *P*), *IL-10*, и *PTCH* биће корелирани с клиничким и демографским карактеристикама пацијената. Том приликом, у зависности од добијених резултата, биће коришћени следећи тестови: *Pearson*-ов тест, *Fisher*-ов тест, *Wilcoxon*-ов тест, и *Kruskal-Wallis*-ов тест.

6. Научна оправданост

У настанку БК најважнију улогу имају наследна предиспозиција и фактори околине, пре свега ултравиолетно зрачење (УВ). Индивидуална преосетљивост на УВ зрачење, између осталог одређена нивоом ензима антиоксидативне одбране, *GST*, утиче на ризик од појаве БК, а присуство одређених типова полиморфизама за овај ген повезан је с предиспозицијом за појаву БК. Генетске алтерације које се у високом проценту налазе како код наследних, тако и код спорадичних БК су алтерације *Hedgehog* сигналног пута, и то пре свега мутације *PTCH1* и *SMO* гена. За *PTCH1* недавно је утврђено да има улогу *gatekeeper* гена. О односу индивидуалне осетљивости на оксидативни стрес (УВ зрачење) и присуство мутација у генима *Hedgehog* сигналног пута и гена који учествују у антитуморском имунском одговору, нема података у литератури, а оскудни су подаци и о генетским алтерацијама у БК различитих локализација у односу на изложеност УВ зрачењу.

Склоност ка настанку БК повезана је с индивидуалним одговором ћелије на оксидативни стрес, изазван између осталог и УВ зрачењем. Тако је утврђено неколико полиморфизама чланова фамилије *GST*, који су одговорни за смањену способност детоксификације

У недавним истраживањима утврђено да *PTCH1* вероватно има улогу супресора тумора инхибирајући прогресију из *G1* у *S* фазу и из *G2* у *M* фазу ћелијског циклуса. Везивање *PTCH1* за *Sonic Hedgehog* доводи до ослобађања продукта "*smoothened*" (*SMOH*) гена и даље активације *GSK-3 β* а затим *GLI* протеина који активирају циљне гене *WNT*, *BMP* и сам *PTCH1*. Различите мутације у овом ембрионалном сигналном путу нађене су у високом проценту БК, указујући на то да је *Hedgehog* пут најзначајнији за карциногенезу БК, али и даље уз неопходно учешће УВ зрачења.

IL-10 је потентни имуносупресивни цитокин чија повећана експресија има улогу у инхибицији антитуморског имунског одговора. Полиморфизам гена за *IL-10* мења продукцију информационог РНК, а тиме и количину створеног протеина. Неколико полиморфизама који утичу на продукцију цитокина могу имати важну улогу у процесу туморогенезе описано је у промотор региону гена за *IL-10*.

Овим истраживањем добио се значајан допринос разумевању могућих различитих молекуларних карактеристика базоцелуларног карцинома у зависности од његове локализације. Такође, добио би се увид у молекуларне карактеристике БК код особа с различитим полиморфизмима за *GST* и *IL-10*, који одређује способност одговора на оксидативни стрес индукован УВ зрачењем и степен имуносупресије, о чему нема података у литератури.

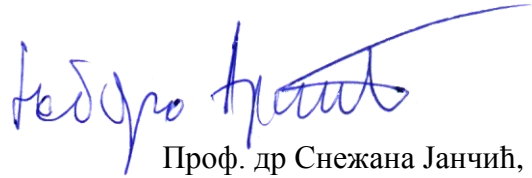
Примена сазнања заснованих на спроведеном истраживању требало би да омогући боље разумевање етиологије и патогенезе БК и идентификацију пацијената код којих постоји повећан ризик за настанак базоцелуларног карцинома.

7. Закључак комисије

На основу горе наведеног, комисија сматра да је израда докторске дисертације кандидата Др Жељка Мијушковића научно оправдана и да ће представљати значајан допринос етиопатогенези и праћењу пацијената са базоцелуларним карциномом, па предлаже Изборном већу Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу да одобри израду овог рада.

Чланови комисије:

Проф. др Небојша Арсенијевић,
редовни професор Медицинског факултета
у Крагујевцу за уже научне области
Микробиологија и имунологија и Онкологија



Проф. др Снежана Јанчић,
редовни професор Медицинског факултета
у Крагујевцу за ужу научну област
Патолошка анатомија



Проф. др Звонко Магић,
редовни професор Војномедицинске академије
у Београду за ужу научну област
Молекуларна медицина



Проф. др Радош Д. Зечевић,
редовни професор Војномедицинске академије
у Београду за ужу научну област
Дерматовенерологија



Доц. др Лидија Кандолф Секуловић,
доцент Војномедицинске академије
у Београду за ужу научну област
Дерматовенерологија

