

Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 25.04.2017. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

Prof. dr Snježana Čolić, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Božidar Brković, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Biljana Jekić, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Sci Sanja Milenković, Kliničko bolnički centar Zemun

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom **ANALIZA STATUSA H-RAS GENA I EKSPRESIJE SURVIVINA I P21 U KERATOCISTIČNIM ODONTOGENIM TUMORIMA PRE I NAKON DEKOMPRESIJE**

Kandidat: dr Ivana Brajić

Mentor: Doc. dr Miroslav Andrić

Komentor: Prof. dr Jelena Milašin

Imenovana Komisija je proučila doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Ivane Brajić pod nazivom **ANALIZA STATUSA H-RAS GENA I EKSPRESIJE SURVIVINA I P21 U KERATOCISTIČNIM ODONTOGENIM TUMORIMA PRE I NAKON DEKOMPRESIJE** napisana je na 142 strane, uz prikaz 39

tabela, 16 slika i 310 referenci iz savremene naučne literature. Disertacija sadrži: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, uvod, naučnu osnovu problema sa hipotezama, ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaključke i literaturu.

Uvod započinje definisanjem keratocističnih odontogenih tumora, a potom je dat kratak opis njihovog epitelnog porekla sa osnovnim podacima poput distribucije tumora po polovima i lokalizaciji. Dijagnostika ovih lezija je detaljno objašnjena kroz opis kliničke slike, makroskopskih, patohistoloških, molekularno-bioloških i radioloških karakteristika, pomoćnih dijagnostičkih sredstava i diferencijalne dijagnoze. Pomenuta je i moguća maligna alteracija ovih tumora. U delu o terapijskim procedurama akcentat je stavljen na dekompresiju praćenu enukleacijom uz primenu Karnojevog rastvora kao jedan od najčešće primenjivanih terapijskih pristupa u lečenju KCOT. Pri tome je dat osvrt na hronološki razvoj različitih terapijskih metoda. Dalje, ukazano je i na efekat dekompresije na smanjenje veličine tumora, kao i hiperplaziju epitela tumora nakon ove procedure. U nastavku su opisani uzroci recidiva KCOT, pri čemu je analiziran uticaj različitih terapijskih metoda na učestalost njihove pojave. Poseban odeljak uvoda posvećen je ulozi gena, regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze na nastanak keratocističnih odontogenih tumora. Genska uloga u nastanku KCOT je objašnjena povezanošću mutacija PTCH1 gena i poremećaja regulacije Sonic Hedgehog puta u KCOT udruženim sa NBCC sindromom. Takođe, navedeni su i rezultati prethodnih studija o uticaju mutacija p53 gena i polimorfizama p53 gena i survivina na nastanak KCOT. Dalje, opisana je uloga RAS gena, njegovog p21ras proteina, kao i 81T/C polimorfizma H-RAS gena, s obzirom da predstavljaju faktor rizika za nastanak raznih tumora organizma, a među njima i oralnih karcinoma. Na kraju su analizirani podaci o ekspresiji survivina i ciklina D1 u KCOT i drugim tumorima.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani: utvrditi prisustvo mutacija na 12. i 13. kodonu H-RAS gena u uzorcima KCOT; analizirati učestalost alela i genotipova T81C polimorfizma H-RAS gena u uzorcima KCOT i kod zdravih pojedinaca i uporediti dobijene rezultate; ispitati ekspresiju survivina, ciklina D1 i p21hras u tkivu KCOT i perikoronarnih folikula i uporediti dobijene rezultate; uporediti ekspresiju ovih proteina u uzorcima KCOT pre i nakon dekompresije; ispitati da li postoji korelacija između navedenih proteina; ispitati da li postoji korelacija između ekspresije ovih proteina i starosne dobi pacijenata, pola i trajanja dekompresije.

U poglavlju **Materijal i metod** detaljno su opisane procedure izvođenja ove kliničko-

laboratorijske studije. U okviru laboratorijskog dela studije opisane su genetička i imunohistohemijska analiza KCOT kao eksperimentalne grupe, pri čemu su uzorci periferne krvi zdravih osoba predstavljali kontrolnu grupu za genetičke analize, a uzorci perikoronarnih folikula neizniklih umnjaka vađenih usled ortodontskih razloga kontrolnu grupu za imunohistohemijsku metodu. Prikupljanje perikoronarnih folikula ujedno je predstavljao i klinički deo studije. S obzirom da su uzorci čuvani u parafinskim blokovima na Odeljenju oralne patologije Stomatološkog fakulteta u Beogradu, u ovom poglavlju je naveden protokol izolacije DNK iz parafina, kao i izolacije iz uzoraka periferne krvi kontrolne grupe. Metode poput PCR-SSCP i sekvenciranja za analizu mutacija H-RAS gena na 12 i 13 kodonu i PCR-RFLP za detektovanje 81T/C polimorfizma H-RAS gena su detaljno prikazane. Pored imunohistohemijske analize ekspresije survivina, ciklin D1 i p21hras proteina u KCOT uzorcima, navedeno je i koje histološke karakteristike tumora su analizirane. U statističkoj obradi podataka navedeni su svi testovi korišćeni za analizu rezultata.

Rezultati studije su podeljeni u dve velike oblasti. U prvom delu su predstavljene demografske karakteristike eksperimentalne grupe i rezultati genetičkih analiza. Prvo su prikazani rezultati SSCP i sekvenciranja uzoraka H-RAS koji su pokazali drugačije kretanje kroz poliakrilamidni gel u odnosu na kontrolnu grupu. U okviru genetičkih rezultata, navedena je i raspodela pojedinačnih genotipova 81T/C polimorfizma H-RAS gena, kao i njegovih alela, kod obolelih i zdravih osoba. Drugi deo ovog poglavlja sadrži prikaz osnovnih podataka pacijenata sa trajanjem dekompresije KCOT kao i broj uzoraka KCOT pre i nakon dekompresije u kojima su detektovane pojedine histološke karakteristike. Ovde je, takođe, kroz tabele i slike, prikazana ekspresija survivina, ciklin D1 i p21hras proteina u KCOT i perikoronarnim folikulima, a potom i komparacija njihove ekspresije pre i nakon dekompresije. Na kraju su prikazani rezultati međusobne korelacije ova tri proteina pre, kao i nakon dekompresije, ali i korelacije ekspresije proteina sa osnovnim podacima pacijenata, trajanjem dekompresije i pojedinim histološkim karakteristikama.

U **Diskusiji** je analizom dobijenih rezultata objašnjeno odsustvo mutacija H-RAS gena, povećana učestalost genotipa TT i alela T 81T/C polimorfizma istog gena kod obolelih osoba, kao i učestalost alela C kod zdravih osoba. Dalje, povećana ekspresija survivina i nepromenjena ekspresija ciklin D1 i p21hras proteina u KCOT nakon dekompresije, kao i ekspresija ovih proteina u perikoronarnim folikulima je, takođe, obrazložena. Izanalizirani su i rezultati korelacije proteina međusobno, ali i proteina sa osnovnim podacima pacijenata, trajanjem dekompresije i pojedinim histološkim karakteristikama. Rezultati histološke analize, kao i svih ostalih prikazanih rezultata u ovoj studiji su poređeni sa nalazima dosadašnjih

istraživanja.

Na osnovu predstavljenih i diskutovanih rezultata izvedeni su **Zaključci** koji predstavljaju jasne odgovore na postavljene ciljeve.

U **Literaturi** je naveden spisak od 301 reference iz savremene i značajne naučne literature.

B. Kratak opis postignutih rezultata

U KCOT primenom PCR-SSCP metode nisu detektovane mutacije na 12. i 13. kodonu H-RAS gena, što je dodatno potvrđeno sekvenciranjem uzoraka koji su pokazali drugačije kretanje DNK kroz poliakrilamidni gel tokom SSCP metode. Ove promene objašnjene su prisustvom različitih genotipova 81T/C poliformizma H-RAS gena, što je potvrđeno PCR-RFLP metodom. Važno je što je nađena statistički značajna razlika u raspodeli genotipova ovog polimorfizma među uzorcima KCOT i kontrolne grupe. Pokazano je da je TT genotip značajno zastupljeniji kod obolelih osoba što ukazuje na dvostruko veći rizik od nastanka KCOT kod nosilaca ovog genotipa u poređenju sa genotipovima CC i TC. Znatno veća zastupljenost genotipa CC je nađena kod zdravih osoba. Takođe, alel C je pokazao dvostruko manji rizik za nastanak tumora, dok je alel T znatno zastupljeniji kod obolelih.

Različite histološke karakteristike kao što su: hiperplazija, inflamacija, ćerke ciste, fokalna rtokeratoza, epitelni produžeci, nekroza, holesterolski kristali, distrofičnekalcifikacije, ostaci odontogenog epitela su nađene u epitelu, odnosno vezivu KCOT i u uzorcima pre i nakon dekompresije, dok su atipija, koilocitoza, čiste i džinovske ćelije detektovane u epitelu, odnosno vezivu uzoraka KCOT uzetih nakon dekompresije. Promene u hiperplaziji i inflamaciji epitela KCOT nakon dekompresije nisu bile statistički značajne, što znači da su KCOT zadržali tipične histološke karakteristike nakon ove terapijske procedure.

Analiza imunohistohemijskih rezultata ukazala je na pozitivnost epitela svih uzoraka KCOT za survivin, ciklin D1 i p21^{hras}. Kod uzoraka ovih tumora uzetih nakon dekompresije detektovana je statistički znatno veća ekspresija survivina, dok je ekspresija ciklina D1 i p21^{hras} proteina nepromenjena. Survivin i ciklin D1 su pokazali jedarnu prebojenost, dok je p21^{hras} nađen u citoplazmiepitelnih ćelija KCOT. Epitel perikoronarnih folikula je bio negativan za ciklin D1, dok su antitela za survivin i p21^{hras} izazvali prebojenost citoplazme epitelnih ćelija.

Spirmanova korelaciona analiza nije pokazala korelaciju između ekspresije survivina, ciklina

D1 i p21hras u uzorcima pre, a ni nakon dekompresije. Takođe, nije nađena ni korelacija između ekspresije ispitivanih proteina nakon dekompresije, odnosno promena u ekspresiji tih proteina i trajanja dekompresije. Dalje, korelacija nije postojala ni između starosti pacijenata i dužine trajanja dekompresije, kao ni između starosti i ekspresije proteina pre dekompresije.

Poređenjem ekspresije survivina, ciklina D1 i p21hras proteina između tumora donje i gornje vilice i u uzorcima uzetim pre i nakon dekompresije nije nađena statistički značajna razlika. Takođe, ni razlika u ekspresiji ispitivanih proteina u uzorcima uzetim pre dekompresije između pacijenata muškog i ženskog pola nije statistički potvrđena. Isto je važno i za uzorke uzete nakon dekompresije. Analizom ekspresije survivina i hiperplazije epitela u uzorcima KCOT kako pre, tako i u uzorcima nakon dekompresije, nije nađena korelacija između ovih parametara. Takođe, nije bilo statistički značajnih razlika u ekspresiji survivina između inflamiranih i neinflamiranih KCOT, ni u uzorcima prikupljenim pre, niti u uzorcima nakon dekompresije.

C. Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Dosadašnja istraživanja nisu se bavila ispitivanjem prisustva mutacija i 81T/C polimorfizma H-RAS gena u KCOT. Mutacije ovog gena su uočene u raznim tumorima organizma, a među njima i u oralnim karcinomima populacije Indije, dok je u populacijama zapadne Evrope i Severne Amerike taj procenat bio zanemarljivo mali ili čak nisu bile prisutne (Field, 1992). Slične nalaze su dali i Clark i Kiaris, pri čemu Clark i autori u svojoj studiji nisu našli prisustvo mutacija H-RAS gena ni u jednom od 20 malignih SCC ranog stadijuma (L. J. Clark et al., 1993), dok su Kiaris i autori među 120 SCC detektovali mutacije na 12. kodonu K-RAS u samo dva tumora, a mutacije na 12. kodonu H-RAS, 61. kodonu N-RAS i 13. kodonu K-RAS nisu nađene (Kiaris et al., 1995).

U ovoj studiji mutacije H-RAS gena na 12. i 13. kodonu nisu detektovane, što sugeriše da takve genske promene ne predstavljaju značajan etiološki činilac u KCOT. Iako u dostupnoj literaturi nema podataka koji bi mogli da se uporede sa rezultatima ove doktorske disertacije, ovakav rezultat je donekle i očekivan, s obzirom na razlike u mehanizmima nastanka i rasta malignih i benignih tumora.

Rezultati RFLP metode pokazuju da 81T/C polimorfizam predstavlja faktor rizika za

nastanak KCOT. Primećeno je da je genotip TT zastupljeniji kod obolelih u odnosu na zdrave osobe, što je u suprotnosti sa nalazima većine istraživanja (Khan et al., 2013; Mir et al., 2015; Pandith et al., 2013; Traczyk et al., 2012; Zhang et al., 2008). Takođe, i u okviru grupe obolelih ovaj genotip je statistički značajno češće prisutan u odnosu na genotipove CC+TC ($p=0,046$). Nosioци genotipa TT pokazuju dvostruko veći rizik za nastanak ovih karcinoma.

U odnosu na druga istraživanja gde je CC genotip sam ili udružen sa TC genotipom, odnosno alel C predstavljao faktor rizika za nastanak tumora i u njima bio zastupljeniji u odnosu na kontrolnu grupu (John & Roots, 2003; Khan et al., 2013; Mir et al., 2015; Pandith et al., 2013; Sathyan et al., 2006; Traczyk et al., 2012; Zhang et al., 2008), u ovoj studiji je genotip CC nađen samo kod zdravih osoba, pa se zaključuje da alel C poseduje protektivnu ulogu i pokazuje dvostruko manji rizik za nastanak KCOT. Ipak, u skladu sa rezultatima ove disertacije, znatno veću zastupljenost genotipa CC u kontrolama u odnosu na zdrave osobe našle su još neke studije (Ivkovic et al., 2009; Rostami et al., 2013; Sanyal et al., 2004), što je objašnjeno etničkom različitosti između populacija, kao i razlikama u vrsti tumora (Ivkovic et al., 2009).

Svi uzorci KCOT uzeti i pre i nakon dekompresije su bili pozitivni za survivin što je u skladu sa drugim istraživanjima koja su dokazala prisustvo ovog proteina u KCOT (M Andric et al., 2010; Miroslav Andric et al., 2012; de Oliveira et al., 2011; Leonardi et al., 2013). Survivin je u uzorcima ove studije detektovan u bazalnom i parabazalnom sloju epitela, što je u skladu sa nalazima Oliveire i saradnika (de Oliveira et al., 2011). Leonardi je našao jaku i umerenu ekspresiju survivina u čitavoj debljini epitela kod rekurentnih i sindromskih KCOT, dok je u sporadičnim tumorima ovaj protein bio slabije ekspimiran i lokalizovan u bazalnom i parabazalnom sloju (Leonardi et al., 2013). I Andrić i autori su primetili bazalnu lokalizaciju survivina (M Andric et al., 2010), što ukazuje na povećanu proliferaciju KCOT.

U KCOT ove studije survivin je bio lokalizovan jedarno, dok su druge studije našle da on može biti ekspimiran i u citoplazmi i u jedru (de Oliveira et al., 2011), ili pak da je citoplazmatska lokalizacija vezana za sporadične KCOT, a jedarna ekspresija zastupljena kod KCOT u okviru NBCCS (Leonardi et al., 2013). U literaturi se navodi da je jedarna lokalizacija survivina povezana sa njegovom ulogom u ćelijskoj proliferaciji, dok je citoplazmatsko bojenje u vezi sa ćelijskim preživljavanjem, ali ne i sa proliferacijom (Fengzhi Li et al., 2005).

U perikoronarnim folikulima, survivin je detektovan u citoplazmi što govori u prilog

tvrdnje Kumamota i autora da je survivin odgovoran za ćelijsko preživljavanje i diferencijaciju u toku razvoja zuba (Kumamoto&Ooya, 2004). Takođe, jedarna lokalizacija survivina u KCOT u poređenju sa citoplazmatskom lokalizaciju u PF ukazuje na veći stepen proliferacije ovih tumora koja doprinosi njihovom agresivnom ponašanju i visokom stepenu rekurentnosti.

Prema rezultatima ove studije, ciklin D1 je eksprimiran u jedru suprabazalnih epitelnih ćelija KCOT. Ovo je u skladu sa prethodnim studijama koje su proučavale ekspresiju ciklina D1 u ćelijama KCOT (de Vicente et al., 2010; Kimi et al., 2001; L. LoMuzio et al., 1999; Taghavi et al., 2013; Vera-Sirera et al., 2015), mada su neke od njih našle prisustvo ovog proteina i u bazalnim ćelijama epitela KCOT (Kimi et al., 2001; Vera-Sirera et al., 2015), dok su druge studije detektovale ciklin D1 i u citoplazmi epitelnih ćelija KCOT (Gurgel et al., 2014; Vera-Sirera et al., 2015). U ovoj studiji perikoronarni folikuli nisu eksprimirali ciklin D1 protein. Iz ovoga se može zaključiti da ciklin D1 igra važnu ulogu u patogenezi odontogenih tumora. Studija de Vicentea i saradnika je pokazala da ameloblastomi ispoljavaju ekspresiju ovog proteina u samo 40% slučajeva, što je značajno manje nego u KCOT (91%) (de Vicente et al., 2010).

U ovoj studiji, po prvi put do sada, detektovana je ekspresija p21 H-RAS proteina u KCOT. On je detektovan u citoplazmi obe ispitivane grupe, što je u skladu sa njegovom lokalizacijom i funkcijom. Ekspresija p21ras je već detektovana u PF od strane Sandrosa i saradnika i to slabijeg intenziteta u spoljašnjem i unutrašnjem gleđnomepitelu, kao i u *retikulumu stelatumu*, dok je zubna papila bila negativna, što je u skladu sa ovim istraživanjem. Prisustvo aktiviranog RAS gena u zubnim zamecima se pripisuje njegovoj ulozi u proliferaciji i diferencijaciji tkiva i organa (Sandros et al., 1991).

Korelacija između survivina, ciklin D1 i p21 H-RAS proteina nije nađena u ovoj studiji. Iz ovoga se zaključuje da su za aktivaciju svakog od ovih proteina odgovorni različiti mehanizmi, iako se zna da mutirani p21ras može da utiče na aktivnost ciklin D1 proteina (Albanese et al., 1995), kao i da H-RAS ima uticaj na survivin (Sommer et al., 2003). Poznato je da p21ras protein utiče na aktivaciju CCND1 gena preko RAS/MAPK/ERK i PIK/Akt puta. Međutim, s obzirom da je ekspresija ciklina D1 registrovana samo u KCOT, dok su PF bili negativni, ekspresija ovog proteina najverovatnije nije povezana sa aktivnošću CCND1.

Takođe, ekspresija proteina nije zavisila ni od lokalizacije lezije, pola i starosti

pacijenta, kao ni od dužine trajanja dekompresije. Nije bilo razlike između ekspresije proteina u lezijama gornje i donje vilice, kao ni u lezijama kod pacijenata muškog i ženskog pola. Ovakvi rezultati potvrđuju još jednom kompleksnu i još uvek nerazjašnjenu etiologiju KCOT.

D. Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Brajić A, Škodrić S, Milenković S, Tepavčević Z, Soldatović I, Čolić S, Milašin J, Andrić M. Survivin, cyclin D1 and p21ras in keratocystic odontogenic tumors before and after decompression. *OralDiseases*. 2016 Jan; 22(3):220-225.

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija **ANALIZA STATUSA H-RAS GENA I EKSPRESIJE SURVIVINA I P21 U KERATOCISTIČNIM ODONTOGENIM TUMORIMA PRE I NAKON DEKOMPRESIJE** dr Ivane Brajić predstavlja značajan naučni doprinos u analizi uticaja genskih mehanizama na nastanak KCOT, kao i uloge dekompresije u lečenju ovih tumora. Na osnovu rezultata istraživanja zaključuje se da mutacije H-RAS gena nemaju uticaj, dok 81T/C polimorfizam H-RAS gena sa genotipom TT i alelom T predstavlja faktor rizika za nastanak KCOT. S obzirom da rezultati studije pokazuju da KCOT nakon dekompresije zadržava tipične histološke karakteristike kao i ekspresiju ciklina D1 i p21ras proteina, može se pretpostaviti da dekompresija ne utiče bitnije na biološke karakteristike ovih lezija, što navodi na zaključak da nakon dekompresije, definitivna hirurška intervencija treba da obuhvati i dopunske metode za smanjenje rizika od nastanka recidiva, kao što je primena Karnojevog rastvora, kao i da ovi pacijenti treba da budu praćeni na isti način kao i pacijenti koji su primarno lećeni enukleacijom tumora. Doktorska disertacija dr Ivane Brajić urađena je prema svim principima naučnog istraživanja sa precizno postavljenim ciljevima, originalnim naučnim doprinosom, savremenom metodologijom rada, adekvatno prikazanim i prodiskutovanim rezultatima i jasno uoblićenim zaključcima. Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu objavljene radove iz oblasti doktorske disertacije, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati

doktorsku disertaciju dr Ivane Brajić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka - stomatologija.

U Beogradu, 04.05.2017. godine

Članovi Komisije:

Prof. dr Snježana Čolić,

Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Božidar Brković,

Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Biljana Jekić,

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Sci Sanja Milenković,

Kliničko bolnički centar Zemun