

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nau nog ve a od 24.12.2015. godine imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije kandidata dr Emilije Manojlovi Ga i , asistenta na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod nazivom:

„Imunohistohemijska analiza ekspresije regulatornih proteina elijskog ciklusa i proliferativnog Ki-67 (MIB-1) indeksa u adenomima hipofize“.

Mentor doktorske disertacije je Prof. dr Milica Skender Gazibara, redovni profesor na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a komentor Prof. dr Vera Popovi Brki , redovni profesor u penziji na Katedri za internu medicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

lanovi komisije za ocenu završene doktorske disertacije su:

1. Prof. dr Jelena Sopta, vanredni profesor na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, predsednik
2. Doc. dr Sandra ur evi Peki , docent na Katedri za internu medicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Nada Vu kovi , redovni profesor, Centar za patologiju i histologiju, Klini ki centar Vojvodine; Katedra za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

lanovi komisije su detaljno prou ili prloženu doktorsku disertaciju i podnose Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu slede i

IZVEŠTAJ

A) PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacije dr Emilije Manojlovi Ga i pod nazivom „**Imunohistohemijska analiza ekspresije regulatornih proteina elijskog ciklusa i proliferativnog Ki-67 (MIB-1) indeksa u adenomima hipofize**“ napisana je na 101 strani i sadži 28 tabela, 6 slika i 11 grafikona. Doktorska diseratacija je podeljena je na 7 poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju i i literatura. Sadržaj doktorske teze, zahvalnica i sažetak na srpskom i engleskom jeziku su prikazani na po etku, dok se biografija i prilozi nalaze na njenom kraju.

Uvod je napisan na 18 strana i sadrži jednu sliku. Podeljen na 3 poglavlja, koja su napisana jasno i koncizno. U prvom poglavlju je opisana morfologija normalne hipofize, i njeni odnosi sa okolnim strukturama. Drugo poglavlje je posvećeno adenomima hipofize i počinje klasifikacijom adenoma hipofize, koja je u daljem tekstu detaljno razrađena. Ukratko su navedeni kriterijumi za makroskopsku i radiološku podjelu adenoma, nakon čega su istaknuti dijagnostički kriterijumi i dileme u patohistološkoj i imunohistohemijskoj dijagnostici svih tipova i podtipova adenoma hipofize. Ovo poglavlje je upotpunjeno kliničkim aspektom tipova adenoma hipofize. Poslednje poglavlje je posvećeno menstrualnom ciklusu, sa naglaskom na njegove markere koji su obrađeni u doktorskoj disertaciji. U ovom poglavlju je naveden i kratak osvrt na pojam senescencije, kao i kratak opis tehnike tkivnog mikroniza.

Tekst je upotpunjen jednom slikom.

Ciljevi istraživanja, napisani na jednoj strani, su jasno definisani, pri čemu je izdvojeno 5 glavnih ciljeva: 1. Ispitivanje ekspresije p16 i p21 u svim podtipovima adenoma hipofize; 2. Poređenje ekspresije p16 i p21 u adenomima sa ekspresijom u adenohipofizi; 3. Poređenje ekspresije p16 i p21 grupe recidivantnih sa grupom nerekidivantnih adenoma; 4. Ispitivanje korelacije ekspresije p16 i p21 sa kliničkim podacima pacijenata (pol, uzrast, indeks telesne mase, veličina tumora, invazivnost tumora); 5. Ispitivanje korelacije ekspresije p16 i p21 sa ekspresijom p53 i Ki-67 u adenomima hipofize.

Poglavlje **materijal i metode** je napisano na 5 strana i sadrži podatke o tipu studije, mestu i vremenu izvođenja istraživanja, načinu selekcije ispitanika, instrumentima merenja i statističkoj obradi rezultata. U poglavlju instrumenti merenja je detaljno objašnjena tehnika konstrukcije tkivnog mikroniza, na čijim presecima su rađena imunohistohemijska bojenja sledećim primarnim antitelima: hormon rasta (HR), prolaktin (PRL), folikulostimulišući hormon (FSH), luteinizirajući hormon (LH), adrenokortikostimulišući hormon (ACTH), tireostimulišući hormon (TSH), steroidni faktor 1 (SF1), za hipofizu specifični pozitivni transkripcioni faktor, p16, p21 i Ki-67 i sa senescencijom udruženu beta-galaktozidazu (SA-β-GAL). U istom poglavlju je detaljno objašnjena i metodologija analize obojenih preseka (automatska i manuelna). Za istraživanje je korišćen biopsijski materijal pacijenata sa adenomima hipofize, koji su dijagnostikovani i hirurški tretirani u periodu od 2002-2011. godine. Takođe je ispitivana korelacija kliničkih podataka (pol, uzrast, indeks telesne mase, veličina i invazivnost tumora) sa navedenim imunohistohemijskim markerima. Posebno su obrađeni pacijenti kojima su dva puta operisani adenomi hipofize. Ovo poglavlje je upotpunjeno jednom slikom.

Poglavlje **rezultati** je napisano na 36 strana i u njemu su navedeni originalni podaci dobijeni u ovom istraživanju. Rezultati su pregledno i sistematično predstavljani kroz 28 tabela, 4 slike i 11 grafikona, uz potrebna objašnjenja u pratećem tekstu, i sistematizovani u skladu sa ciljevima istraživanja.

Diskusija dobijenih rezultata je napisana jasno i pregledno na 24 strane. U diskusiji je uinjena komparativna analiza rezultata sa dosadašnjim rezultatima iz literature, uz tumačenje sličnosti i razlika. Navedene su prednosti i nedostaci sprovedenog istraživanja.

Poglavlje **zaključci** je izneto na 2 strane, u vidu jasno definisanih konstatacija, koje su u skladu sa postavljenim ciljevima.

Poglavlje **literatura** je sastavljeno iz 164 bibliografske jedinice iz referentnih međunarodnih časopisa, pretežno publikovanih u poslednjih 5 godina, koji su poređeni po redosledu po kome se citiraju u tekstu disertacije.

B) OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati se odnose na 345 pacijenata sa dijagnozom adenoma hipofize. Adenomi su grupisani u tipove i podtipove adenoma u odnosu na ekspresiju hormona adenohipofize, u skladu sa kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije, a njihova distribucija je bila u skladu sa do sada objavljenim hirurškim serijama.

Vrlo niske vrednosti procenata p16 pozitivnih jedara u adenomima hipofize, koje se ne razlikuju između tipova i podtipova adenoma sugerišu da ekspresija ovog markera nije hormonski zavisna. Za razliku od nje, ekspresija p21 pokazuje značajne oscilacije između tipova adenoma, pri čemu su po prvi put obrađene razlike između podtipova HR produkuju ih adenoma, i u ovoj statistici značajne razlike: procenat p21 pozitivnih jedara je bio najviši kod slabo granuliranih HR produkuju ih adenoma, uz statistički značajnu razliku u odnosu na grubo granulirane HR produkuju ih adenome. Vrednosti citoplazmatske p21 pozitivnosti su bile vrlo niske kod svih adenoma, sa najvišim vrednostima kod gonadotropnih adenoma. SA-β-GAL je takođe pokazao varijabilnost u ekspresiji između tipova i HR produkuju ih podtipova adenoma hipofize, uz najintenzivnije bojenje kod grubo granuliranih adenoma, koje je statistički značajno intenzivnije od slabo granuliranih HR produkuju ih adenoma.

Snižena ekspresija p16 i p21 u adenomima hipofize, u odnosu na njenu ekspresiju u adenohipofizi, koja dostiže statističku značajnost, ukazuje na njenu povezanost sa tumorigenezom. Značajna je i intenzitet bojenja na SA-β-GAL u odnosu na bojenje u normalnoj adenohipofizi, sugeriše aktivaciju senescencije u adenomima hipofize.

U ovoj su vrlo blage oscilacije analiziranih markera u uzorcima adenohipofize pacijenata koji su dva puta operisani.

Ekspresija analiziranih markera nije povezana sa polom. Međutim, u ovoj je statistici značajna pozitivna korelacija između citoplazmatske p21 ekspresije i starosti pacijenata, kao i indeksa telesne mase. Takođe je nađena negativna korelacija intenziteta SA-β-GAL bojenja i starosti pacijenata.

Statistički više vrednosti procenata pozitivnih p16 jedara u mikroadenomima hipofize, u poređenju sa makroadenomima, i odsustvo razlike između makroadenoma i gigantskih adenoma ukazuje na značaj gubitka aktivnosti p16 u procesu tumorigeneze.

Ve a vrednost proliferativnog Ki-67 indeksa u adenomima hipofize sa supra i paraselarnom propagacijom u odnosu na adenome ija je propagacija bila u drugim smerovima ukazuje da je proliferativna aktivnost potencijalno uslovljena/udružena sa nekim drugim faktorima koji doprinose invazivnosti adenoma, a da to nisu inhibitori ciklin zavisnih kinaza.

C) UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA REZULTATIMA DOBIJENIM IZ LITERATURE

U doktorskoj disertaciji je u injena iscrpna i pregledna komparacija dobijenih rezultata sa relevantnim literaturnim podacima drugih autora koji se bave prou avanjem poreme aja elijskog ciklusa i senescencije u adenomima hipofize. Ve ina dosadašnjih istraživanja je bila sprovedena na zna ajno manjem uzorku nego što je uzorak obra en u ovom istraživanju, pri emu, je vrlo mali broj istraživanja ura en uz pomo tehnike tkivnog mikro niza.

Nuklearna ekspresija proteina p16 je u ovom istraživanju bila statisti ki zna ajno niža nego u tkivu adenohipofize, pri emu nisu uo ene zna ajne razlike izme u tipova i podtipova adenoma hipofize. Rezultati dobijeni u ovoj studiji predstavljaju verifikaciju prethodnih istraživanja, budu i da je istrživanje izvedeno na velikom uzorku. Smatra se da smanjenje ekspresije p16 u adenomima hipofize, u odnosu na normalnu hipofizu predstavlja jedan od faktora tumorigeneze adenoma hipofize, i da nije pod uticajem produkcije hormona. Farrell i saradnici su dokazali da je uzrok smanjenja ekspresije p16 metilacija promotora gena u adenomima hipofize.

Nuklearna p21 ekspresija je u prikazanim rezultatima bila zna ajno niža u adenomima hipofize nego u adenohipofizi, pri emu je uo en varijabilitet u ekspresiji izme u tipova adenoma hipofze, a što je u skladu sa prethodnim istraživanjima grupe Grosmana i Melmeda. U skladu sa literaturnim podacima je tako e i podatak da su HR produkuju i adenomi pokazali najviši, a gonadotrofni adenomi najniži procenat p21 pozitivnih jedara. U ovoj studiji istraživanju je u injena analiza nuklearne p21 ekspresije u tipovima HR produkuju ih adenoma. Najviši procenat p21 pozitivnih jedara kod slabo granuliranih HR produkuju ih adenoma, koji je zna ajno niži u odnosu na grubo granulirane adenome otvara pitanje strukturisanosti grupa prethodno analiziranih HR produkuju ih adenoma u odnosu na granuliranost. Tako e, ovi rezultati ukazuju da klini ki agresivno ponašanje slabo granuliranih adenoma hipofize može biti povezano sa, potencijalno, nesvrishodnom pove anom sintezom inhibitora ciklin zavisne kinaze, p21.

Citoplazmatska ekspresija u adenomima hipofize je bila slabije izražena u tkivu adenoma nego u tkivu adenohipofize, pri emu su sve analizirane vrednosti bile niske. Najviši skor bojenja su imali gonadotrofni adenomi, ije su vrednosti bile statisti ki više od vrednosti HR i TSH produkuju ih adenoma. Prema iznetim saznanjima, do sada je samo još jednoj publikaciji (Alexandraki i saradnici, 2012) analizirana citoplazmatska p21 pozitivnost, pri emu su u navedenom radu adenomi hipofize su bili grupisani u odnosu na svoju funkcionalnost.

Nefunkcionalni adenomi imali najveće u citoplazmatsku p21 ekspresiju, što se delimično može shvatiti kao potvrda rezultata u ovoj disertaciji, budući da su većinu nefunkcionalnih adenoma hipofize sačinjavali gonadotrofni adenomi. Međutim, podatak u ovoj disertaciji da je citoplazmatska ekspresija p21 bila viša u gonadotrofnim adenomima nego u null-cell adenomima, bez dostizanja statističke značajnosti, ukazuje na značajnost doprinosa ovog istraživanja, kao i na potrebu za produbljivanjem i nastavkom istog.

Intenzitet bojenja na SA-β-GAL je bio već u adenomima hipofize, nego u adenohipofizi, što je u skladu sa literaturnim podacima. Ono što razlikuje ovu studiju od prethodnih radova Melmeda i Grosmana, u kojima je bojenje ovim antitelom bilo fokalno, je difuzni obrazac bojenja, a što bi se moglo objasniti upotrebom različitih antitela. Tako je u skladu sa literaturnim podacima i rezultat da je SA-β-GAL bojenje najintenzivnije bilo u HR produkujućim adenomima, ukazujući na najintenzivniju aktivaciju senescencije u njima. Međutim, podela HR produkujućih adenoma u odnosu na obrazac granuliranosti otkrila je statistički značajne razlike, pri čemu je intenzitet bojenja SA-β-GAL bio već i kod gusto granuliranih HR produkujućih adenoma, a što do sad nije opisano u literaturi. Navedeni rezultati nisu u potpunosti u skladu sa rezultatima Chesnokove i saradnika, budući da je u ovom istraživanju potvrđeno sinhrono povećanje nuklearne p21 ekspresije i SA-β-GAL u HR produkujućim adenomima hipofize, ali je takođe pokazano da obrazac granuliranosti značajno utiče na ekspresiju ovih markera, dovodeći do njihove značajne disocijacije. Ova disocijacija je u skladu sa biološkim ponašanjem slabo i gusto granuliranih adenoma, a što su detaljno opisali Fougner i Kiseljak-Vassiliades sa saradnicima. Rezultati ove disertacije su po prvi put pokrenuli pitanje uticaja granuliranosti adenoma hipofize na aktivaciju senescencije. Ovo bi moglo biti i u prilog tvrdnjama Judith Campisi da je senescencija multifaktorijalan proces, čiji mehanizmi još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni.

U ovom istraživanju je uočena blaga oscilacija analiziranih markera kod rekurentnih adenoma hipofize, koja nije dostigla statističku značajnost. Međutim, Ki-67, koji je bio značajno viši u grupi ponovljenih hirurških intervencija. Dosadašnji literaturni podaci govore da je povećan proliferativni Ki-67 indeks u rekurentnim adenomima, što je prouzročeno povećanom sintezom ciklina i hromozomskim disbalansima. Međutim, budući da u ovom istraživanju nije uočena slabija ekspresija inhibitora ciklin zavisnih kinaza, kao ni SA-β-GAL, zaključeno je da u osnovi ubrzane proliferacije se najverovatnije ne nalazi inaktivacija senescencije. Istovremeno se naglašava kompleksnost ćelijskog ciklusa i potreba za njegovim daljim izučavanjem, naročito u adenomima hipofize.

Analizirani markeri ćelijskog ciklusa nisu pokazali statistički značajne razlike između grupa invazivnih adenoma i smerova njihovog širenja. Izuzetak je već dobro poznati prognostički marker Ki-67, koji je bio najviši u grupi adenoma sa supra/paraselarnim širenjem. Sprovedeno istraživanje je pokazalo rezultate određivanja proliferativnog Ki-67 indeksa na uzorcima dobijenim tkivnim mikronizacijom, što do sada u literaturi nije opisano. Naime, brojanje je vrešeno na celom uzorku, pri čemu su cilindri za konstrukciju tkivnog mikroniza bili odabrani slučajno. Vrednosti proliferativnog Ki-67 indeksa u ovom istraživanju su bile značajno niže nego u

prethodnim istraživanjima Trouillas i Gejmana, što ukazuje da potencijalnu prednost u evaluaciji okog indeksa ima manuelni odabir polja, kao i da proliferativni indeks treba procenjivati na mestu njegovih najviših vrednosti.

U ovom istraživanju nisu uočene značajne razlike u ekspresiji p53 i proliferativnom Ki-67 indeksu između tipova adenoma hipofize, čime su potvrđena prethodna istraživanja i stanovišta Svetske zdravstvene organizacije.

Prilikom komparacije analiziranih markera između mikroadenoma, makroadenoma i gigantskih adenoma, uočena je samo značajno više vrednosti p16 kod mikroadenoma u poređenju sa makroadenomima, što ide u prilog literaturne spekulacije (Pease i saradnici, 2013) o uključenosti p16 u tumorigenezu adenoma hipofize, a opadanju njegove funkcije tokom rasta tumora.

D) OBJAVLJENI ILI SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO TEZE

Radovi u časopisu indeksiranom u CC/SCI:

1. **Manojlovic Gacic E**, Skender-Gazibara M, Soldatovic I, Dundjerovic D, Boricic N, Raicevic S, Popovic V. Immunohistochemical Expression of p16 and p21 in Pituitary Tissue Adjacent to Pituitary Adenoma versus Pituitary Tissue Obtained at Autopsy: Is There a Difference? *Endocr Pathol.* 2015;26:104-110. (M23, IF 1.757)
2. **Manojlovic Gacic E**, Skender-Gazibara M, Popovic V, Soldatovic I, Boricic N, Raicevic S, Pekic S, Doknic M, Miljic D, Alafuzoff I, Pontén F, Casar-Borota O. Oncogene-Induced Senescence in Pituitary Adenomas-an Immunohistochemical Study. *Endocr Pathol.* 2015 Nov 14. [Epub ahead of print] (M23, IF 1.757)

E) ZAKLJUČAK (OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE)

Doktorska disertacija dr Emilije Manojlović Gašić, pod nazivom „**Imunohistohemijska analiza ekspresije regulatornih proteina p53 i ciklina D1 u adenomima hipofize**“ predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju regulacije p53 ciklusa i aktivacije senescencije u adenomima hipofize. Istraživanje na velikom uzorku tkiva adenoma hipofize, uz pomoć metode tkivnog mikro niza, je sprovedeno po prvi put u našoj zemlji. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji ukazuju po prvi put na uticaj obrasca granuliranosti HR proizvode ih adenoma hipofize na aktivaciju p53 ciklusa i senescencije, i doprinosi razumevanje razlika u kliničkoj prezentaciji ovih tumora.

Komisija zaključuje da je istraživanje sprovedeno u skladu sa najvišim standardima naučno-istraživačkog rada. Disertacija je napisana jasno, ciljevi su precizno definisani, rezultati su saopšteni pregledno uz odgovarajuće tabelarne i grafičke prikaze. U diskusiji je napravljen kritički osvrt na dobijene rezultate, koji je potkrepljen komparacijom sa podacima iz savremene literature.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, Komisija predlaže Naučnom vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Emilije Manojlović Gašić i odobri njenu odbranu, radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 17.02.2016.

Mentor

Članovi komisije

Prof. dr Milica Skender Gazibara

Prof. dr Jelena Sopta

Komentor

Prof. dr Vera Popović Brkić

Doc. dr Sandra Čurčević Peči

Prof. dr Nada Vučković