

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

Na sednici Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 05.07.2022. godine, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom

“Ekspresija proteina poroznih veza, koneksina-43, u primarnim i metastatskim nesitnoćelijskim karcinomima pluća”

kandidata dr Ivane Savić, zaposlene na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Mentori su prof. dr Dejan Oprić i prof. dr Nebojša Ivanović sa Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Vesna Škodrić Trifunović, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Doc. dr Sofija Glumac, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Doc. dr Vesna Škuletić, Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nastavno-naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Ivane Savić napisana je na ukupno 77 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i reference. U disertaciji se nalazi ukupno 57 tabela i 17 slika. Doktorska disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** su opisane osnovne epidemiološke karakteristike kao i klinička slika karcinoma pluća, a definisani su i histopatološki tipovi i sumirana terapija karcinoma pluća. Detaljno su opisane struktura, karakteristike i značaj poroznih veza, a dat je i pregled ekspresije koneksina 43, proteina poroznih veza, u različitim malignim tumorima u literaturi. Dat je i pregled osnovnih podataka o epitelnomezenhimnoj tranziciji i njenoj povezanosti sa tumorskim procesima. Jasno je naglašeno da nema dovoljno podataka u literaturi o ekspresiji koneksina 43 u karcinomima pluća.

Ciljevi rada su precizno formulisani. Definisani su sledeći ciljevi: 1) Ispitati ekspresiju i razliku u ekspresiji koneksina-43 u različitim histopatološkim tipovima nesitnoćelijskog karcinoma pluća; 2) Ispitati ekspresiju koneksina-43 u invazivnom tumorskom frontu i centralnom delu kod primarnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća; 3) Utvrditi povezanost ekspresije koneksina-43 sa markerima epitelno-mezenhimne tranzicije kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća; 4) Ispitati razlike u ekspresiji koneksina-43 između primarnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća i njegovih limfogenih i hematogenih metastaza.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da su u ovom istraživanju korišćene dve grupe uzoraka. Jednu grupu su činili parafinski kalupi tkivnih uzoraka hirurških resekcija pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća sa pripadajućim limfnim čvorovima, operisanih u Kliničko-bolničkom centru „Bežanijska kosa“ u Beogradu u periodu između 2012. i 2016. godine, dok su drugu grupu činili parafinski kalupi tkivnih uzoraka primarnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća kao i prisutnih limfogenih i hematogenih metastaza dobijenih sa obdukcija na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu u periodu između 2016. i 2020. godine. Jasno su definisani kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz studije. Jasno je opisana priprema tkivnih uzoraka i imunohistohemijska analiza. Opisane su i metode statističke analize dobijenih podataka. Istraživanje je sprovedeno uz saglasnost Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U poglavlju **rezultati**, detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati. Ilustrovani su velikim brojem tabela i slika, a predstavljeni su i rezultati statističke analize podataka.

Diskusija je napisana jezgrovito, jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. Jasno su interpretirani dobijeni rezultati i diskutovan je njihov značaj u kontekstu patologije karcinoma pluća.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Direktno su korišćene i citirane 64 **reference**.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije dr Ivane Savić, utvrđeno podudaranje teksta iznosi 7%. Ovaj stepen podudarnosti je posledica podudaranja složenih imena pojmova, tehničkih parametara koji se koriste u istraživanjima, nekih citata, opštih mesta i podataka, slučajnih preklapanja nekih od fraza i brojeva, ili sličnosti u primeni statističkih testova, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

C) Kratak opis postignutih rezultata

Dobijeni rezultati su pokazali da i skvamozni karcinom i adenokarcinom pluća često eksprimiraju koneksin 43. Međutim, skvamozni karcinom je pokazao značajno veći stepen ekspresije kao i veći intenzitet ekspresije koneksina 43 u odnosu na adenokarcinom. Ekspresija koneksina 43 u nesitnoćelijskim karcinomima pluća je često aberantna po lokalizaciji, tj. koneksin 43 je eksprimiran u citoplazmi ili čak u jedru, u odnosu na tipičnu membransku lokalizaciju. Pored izolovane membranske, citoplazmatske, i nuklearne ekspresije, bili su prisutni i slučajevi kombinovane membranskocitoplazmatske i nuklearnocitoplazmatske ekspresije. Lokalizacija ekspresije koneksina 43 je bila statistički značajno drugačija u skvamoznom karcinomu nego u adenokarcinomu. Naime, lokalizacija ekspresije koneksina 43 kod skvamoznih karcinoma je najčešće bila kombinovana, dok je kod adenokarcinoma podjednako često bila čisto citoplazmatska i kombinovana. Analiza ekspresije koneksina 43 u nesitnoćelijskim karcinomima pluća je pokazala da i invazivni front i centralni deo tumora često eksprimiraju koneksin 43. Nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji koneksina 43 između invazivnog fronta i centralnog dela tumora kako u adenokarcinomu tako i u skvamoznom karcinomu. Međutim, kod adenokarcinoma je nađena

statistički značajno veća ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama u centralnom delu tumora nego u invazivnom frontu tumora, što nije potvrđeno kod skvamoznog karcinoma. Pokazano je i da ekspresija koneksina 43 korelira sa ekspresijom markera epitelnomezenhimne tranzicije kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća, ali su uočeni različiti obrasci korelacije između adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma. U centralnom delu tumora, postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji E-kadherina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 i kod adenokarcinoma i kod skvamoznog karcinoma, dok je u invazivnom frontu tumora i limfogenim metastazama postojala značajna razlika samo kod skvamoznog karcinoma. U centralnom delu tumora i limfogenim metastazama, postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji β -katenina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 i kod adenokarcinoma i kod skvamoznog karcinoma, dok je u invazivnom frontu tumora postojala značajna razlika samo kod skvamoznog karcinoma. U centralnom delu tumora i invazivnom frontu, postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji vimentina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 i kod adenokarcinoma i kod skvamoznog karcinoma, dok je u limfogenim metastazama postojala značajna razlika samo kod skvamoznog karcinoma. Analiza ekspresije koneksina 43 na hirurškom materijalu je pokazala da su limfogene metastaze skvamoznog karcinoma imale ekvivalentnu ekspresiju koneksina 43 kao primarni tumor, dok su limfogene metastaze adenokarcinoma u približno jednoj trećini slučajeva pokazale promenjen profil ekspresije koneksina 43 u odnosu na primarni tumor. Ispitivanjem ekspresije koneksina 43 na obdukcijском materijalu nisu nađene statistički značajne razlike u ekspresiji koneksina 43 između primarnog tumora i metastaza u limfnim čvorovima, niti između primarnog tumora i pripadajuće hematogene metastaze kod oba ispitivana patohistološka tipa.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Na osnovu analize imunohistohemijske ekspresije koneksina 43 na celim presecima tkivnih isečaka primarnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća, ova disertacija je pokazala da više od 65% uzoraka eksprimira koneksin 43. Međutim, pokazala je i da postoje značajne razlike između histoloških tipova nesitnoćelijskih karcinoma pluća. Naime, skvamozni karcinom ima značajno izraženiju ekspresiju (visok procenat tumorskih ćelija pozitivnih na koneksin 43) kao i veći intenzitet ekspresije na koneksina 43 u odnosu na adenokarcinom pluća. Slični rezultati su dobijeni i analizom tkivnih mikronizova ovih tumora gde je skvamozni karcinom konzistentno pokazivao veću ekspresiju koneksina 43 u poređenju sa adenokarcinomom. Podaci o imunohistohemijskoj ekspresiji koneksina 43 u karcinomu pluća su vrlo oskudni u literaturi. Zhao i saradnici su ispitivali ekspresiju koneksina 43 kod 25 pacijenata sa adenokarcinomom i 19 pacijenata sa skvamoznim karcinomom pluća. Ovi autori su pokazali veću ekspresiju Cx43 mRNA i veću imunohistohemijsku ekspresiju koneksina u adenokarcinomima u odnosu na skvamozne karcinome pluća što je u suprotnosti sa rezultatima ove disertacije. Nije dovoljno jasno koji je razlog za ovakvu razliku u rezultatima, ali je moguće da su razlici doprineli manji uzorak u njihovoj studiji, znatno mlađa populacija pacijenata, i rasa (azijska populacija).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja u literaturi, može se zaključiti da se ekspresija koneksina 43 razlikuje između različitih tipova tumora, kao i između različitih stadijuma istog tumora. Ekspresija koneksina 43 je normalno membranska, a aberantnom ekspresijom se smatraju citoplazmatska i nuklearna ekspresija. Dosadašnja istraživanja uloge koneksina 43 su dala protivrečne rezultate. Brockmeyer i saradnici (2014) su pokazali da je veća ekspresija koneksina u skvamoznom karcinomu u odnosu na normalnu mukozu usne duplje, i da je viši nivo membranske ekspresije koneksina 43 bio povezan sa lošijim preživljavanjem. Slično tome, Tanaka i saradnici (2016) su pokazali da je ekspresija koneksina 43 povezana sa lošijim

preživljavanjem kod pacijenata sa skvamoznim karcinomom jednjaka. Tang i saradnici (2011) su ispitali ekspresiju koneksina 43 na uzorcima primarnih karcinoma želuca i njihovih metastaza, i pokazali da je u primarnim karcinomima želuca, imunohistohemijska ekspresija koneksina 43 bila znatno manja u odnosu na okolnu normalnu sluznicu, što sugerise da smanjena ekspresija koneksina 43 može da doprinese inicijaciji karcinoma želuca. Sa druge strane, Puzzo i saradnici (2016) su pokazali da je petogodišnje preživljavanje pacijenata sa karcinomom larinksa oko 60% kod koneksin 43 pozitivnih tumora i ispod 40% kod koneksin 43 negativnih tumora. Stoletov i saradnici su ispitali ekspresiju koneksina 43 kod metastaza karcinoma dojke u moždanom parenhimu. Pokazali su da je prisutna pojačana ekspresija koneksina 43 u metastatskim deponitima u odnosu na normalni moždani parenhim (Stoletov i sar., 2013).

Budući da je koneksin 43 integralni transmembranski protein, normalna tkiva ga ekspimiraju membranski u imunohistohemijskim bojenjima. Za razliku od toga, prethodne studije su pokazale dominantno aberantnu, citoplazmatsku ekspresiju koneksina 43 u tumorima (npr. Cogliati i sar., 2016; Brockmeyer i sar., 2014). Nema detaljnih podataka o subcelularnoj lokalizaciji koneksina u karcinomima pluća, ali podaci iz studije na pacijentima sa karcinomom dojke pokazuju dominaciju citoplazmatske lokalizacije koneksina 43 u primarnim tumorima, dok limfogene metastaze imaju dodatnu izraženu membransku pozitivnost (Kanczuga-Koda i sar., 2006). Rezultati ove disertacije su pokazali pretežno aberantnu lokalizaciju ekspresije koneksina 43 u nesitnoćelijskim karcinomima pluća, budući da je retko bila čisto membranska, već uglavnom čisto citoplazmatska, kombinovana membranskocitoplazmatska, i ponekad čak nuklearna.

Nema podataka u literaturi u vezi sa razlikama u ekspresiji koneksina 43 između invazivnog fronta i centralnog dela tumora kod nesitnoćelijskih karcinoma pluća. Studija na adenokarcinomu kolona je pokazala veću ekspresiju koneksina 43 u invazivnom frontu (Han i sar., 2011), što sugerise da koneksin 43 igra određenu ulogu u karcinogenezi i tumorskoj progresiji preko poroznih veza ili preko nekih drugih signalnih puteva kao što je Wnt/ β -catenin.

Prethodne studije su pokazale da je epitelnomezenhimna tranzicija povezana sa metastazama, stečenom rezistencijom na lekove, kao i progresijom mnogih tumora, ali postoji nedovoljno podataka na tumorima pluća. Posebno imajući u vidu potencijalnu vezu između koneksina 43 i epitelnomezenhimne tranzicije, deo ovog istraživanja je obuhvatio analizu odnosa ekspresije koneksina 43 sa ekspresijom markera epitelnomezenhimne tranzicije kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća, budući da su ovi markeri važan pokazatelj progresije tumora i rizika od metastaziranja. U ovom istraživanju je pokazano da postoji određena veza između ekspresije koneksina 43 i ekspresije markera epitelnomezenhimne tranzicije, ali je uočeno i da se obrazac ove veze razlikuje između adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma kako u primarnom tumoru (invazivni front i centralni deo tumora) tako i u limfogenoj metastazi karcinoma pluća. Ukoliko se zajedno sagledaju rezultati koji se odnose na povezanost između ekspresije koneksina 43 i markera epitelnomezenhimne tranzicije, može se primetiti da uglavnom postoji suprotan obrazac veze između ekspresije koneksina 43 i markera epitelnomezenhimne tranzicije kod adenokarcinoma u odnosu na skvamozni karcinom.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Savic I, Milovanovic P, Opric S, Ivanovic N, Opric D. Expression of connexin-43 in surgical resections of primary tumor and lymph node metastases of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung: a retrospective study. PeerJ. 2022;10:e13055. doi: 10.7717/peerj.13055. **M22, IF2021 = 3,061 (IF 2020 = 2,984)**

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Ekspresija proteina poroznih veza, koneksina-43, u primarnim i metastatskim nesitnoćelijskim karcinomima pluća**“ dr Ivane Savić je rasvetlila kakva je ekspresija koneksina 43 u različitim histopatološkim tipovima nesitnoćelijskog karcinoma pluća, što može da bude od koristi kao dodatni parametar u diferenciranju ovih tipova karcinoma, posebno imajući u vidu da je adenokarcinom značajno ređe i manje ekspimirao koneksin 43 u odnosu na skvamozni karcinom. Budući da je od izuzetnog značaja otkrivanje novih markera biološkog ponašanja nesitnoćelijskog karcinoma pluća, ovo istraživanje postavlja osnovu da bi se ustanovilo da li se koneksin 43 može koristiti kao dijagnostički biomarker ili kao marker rizika od nastanka metastaza u karcinomima pluća.

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 Naučno-nastavnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Ivane Savić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 11.07.2022.

Mentori:

Prof. dr Dejan Opić

Prof. dr Nebojša Ivanović

Članovi Komisije:

Prof. dr Vesna Škodrić Trifunović

Doc. dr Sofija Glumac

Doc. dr Vesna Škuletić