

## NAUČNO IZVEŠTAJE U MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog odbora od 23.10.2015. godine imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije kandidata mr sci dr Sofije Glumac, asistenta na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod nazivom „**Značaj poremećaja gena regulatora elijskog ciklusa i ekspresije njihovih proteina u rabdomiosarkomu**“. Mentor doktorske disertacije je Prof. dr Jelena Sopta, vanredni profesor na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Članovi Komisija za ocenu završene doktorske disertacije su:

1. Prof. dr Jovan D. Vasiljevi - Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Gordana Basta- Jovanovi - Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Vera Bunjeva ki- Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. Doc. dr Sanja Radojevi -Škodri - Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Dragoljub Baceti - profesor u penziji

Članovi Komisije su detaljno proučili ili priloženu doktorsku disertaciju i podnose Naučnom odboru u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeće izveštaje:

### IZVEŠTAJ

#### A) PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dr Sofije Glumac „**Značaj poremećaja gena regulatora elijskog ciklusa i ekspresije njihovih proteina u rabdomiosarkomu**“ napisana je na 132 strane i sadrži 40 tabela, 27 slika i 53 grafikona. Podeljena je na sledeće poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

Poglavljje **UVOD** sadrži 35 stranica, a podeljeno je u 16 podnaslova, kojima prethodi opšte razmatranje i istorijski aspekti rabdomiosarkoma (RMS). Ukratko je dat istorijski osvrt na prve rukopise o kliničko-patološkim karakteristikama ovog tumora.

U uvodu su prikazane dileme u pogledu porekla ovog tumora, a što je od značaja za razumevanje njegove patogeneze. Detaljno su prezentovani podaci o RMS, koji uključuju incidencu, starosnu i polnu distribuciju, kliničku prezentaciju, makroskopski i histopatološki izgled tumora, kao i prognozu i faktore.

Takođe, dat je prikaz dosadašnjih i aktuelne kliničke klasifikacije RMS Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group (IRSG) i Children's Oncology Group (COG) po kliničkim stadijumima i grupama rizika. Prikazani su molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi RMS,

pri emu je naročito naglašen značaj uloge proteina regulatora elijskog ciklusa, apoptoze i epigenetičkih procesa u nastanku humanih maligniteta, uključujući i RMS.

Razmatrana su dosadašnja saznanja o kliničkim i biološkim prognostičkim parametrima i ističe njihovu značajku za temu kojom se ova doktorska disertacija bavi.

Tekst je upotpunjen sa 13 slika i 4 tabele.

**CILJEVI ISTRAŽIVANJA** su precizno definisani, i izdvojeno je 5 glavnih ciljeva: 1. Primenom metode tkivnog mikroniza (engl. tissue microarray - TMA) analizirati imunohistohemijsku ekspresiju proteina regulatora elijskog ciklusa i apoptoze u slučajevima RMS; 2. Rezultate imunohistohemijske analize korelirati sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata sa RMS (lokalizacija, veličina tumora, histološki tip, starost, zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa, metastaze i ukupno preživljavanje); 3. Analizirati obrasce metilacije promotora gena p16 metil-specifičnom PCR metodom; 4. Utvrditi stepen korelacije između obrazaca metilacije promotora gena p16 i kliničko-patoloških karakteristika RMS; 5. Definirati nezavisne prognostičke faktore značajne za prognozu RMS na osnovu dobijenih rezultata imunohistohemijskog ispitivanja proteina elijskog ciklusa i apoptoze i metilacionog statusa promotora gena p16.

Poglavlje **MATERIJAL I METOD** je napisano na 12 stranica. Za istraživanje je korišten biopsijski materijal bolesnika sa RMS, koji su dijagnostikovani i leženi u periodu od 1994-2014 godine. Analizirani su sledeći klinički podaci: pol, starost, lokalizacija i veličina tumora, histološki tip i gradus, zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa, prisustvo udaljenih metastaza i ishod bolesti. Posmatrano je ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS na petogodišnjem nivou.

Metodološki pristup objašnjen je posebnim odeljcima: Histološka obrada uzoraka RMS, Konstruisanje tkivnog mikroniza, Imunohistohemijske metode, Genetske analize. Poslednji odeljak ovog poglavlja disertacije odnosi se na korišćenje statističke metode u obradi podataka.

U ovoj studiji primenjena je tehnika tkivnog mikroniza za dobijanje parafinskih kalupa (TMA kalup). Na tkivnim preseccima sa TMA kalupa su urađena imunohistohemijska bojenja u laboratoriji za imunohistohemiju Instituta za patologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu. Izvršeno je streptavidin-biotin imunohistohemijsko bojenje pomoću primarnih antitela, specifičnih za: ciklin A, ciklin D1, p16, p57, survivin i nestin. Za analizu metilacionog statusa p16 gena korišćene su odgovarajuće metode molekularne genetike.

Tekst je upotpunjen sa 2 tabele.

Originalni podaci koji su dobijeni u ovom istraživanju izneti su u poglavlju **REZULTATI**, koje sadrži 33 strane. Rezultati su pregledno i sistematično predstavljani u formi 13 grafikona, 14 slika i 14 tabele, a sistematizovani su u skladu sa postavljenim ciljevima.

**DISKUSIJA** dobijenih rezultata napisana je jasno i pregledno na 19 stranica. Na detaljan način analizirani su dobijeni rezultati, uz integrativni pristup problematici definisanja nezavisnih prognostičkih parametara RMS. Prikazani su podaci drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Poglavlje **ZAKLJUČCI** je izneto na 1 stranici u formi jasno definisanih konstatacija, redosledom koji odgovara postavljenim ciljevima.

U poglavlju **LITERATURA** citirano je 287 bibliografskih jedinica iz referentnih i domaćih asopisa.

## B) OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati se odnose na 67 bolesnika sa dijagnozom RMS. Većina ispitanika je muškog pola (68,7%), prosečna starost od 35 godina. Tumor je bio najčešće lokalizovan u predelu ekstremiteta (68,7%), sa približno ravnomernom distribucijom u odnosu na histološki tip. Kod 60% slučajeva tumor je bio veći od 5cm. Zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova ( $N_0$ ) nije bila prisutna kod 62,7% pacijenata, a udaljene metastaze ( $M_0$ ) nisu dijagnostikovane kod 52,2% slučajeva. Nešto više od polovine obolelih (52,2%) na kraju ispitivanja je bilo živo. Ispitivanjem odnosa kliničko-patoloških parametara i ishoda bolesti, značajnim su se pokazali starost pacijenata, veličina tumora, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, prisustvo udaljenih metastaza, histološki tip i gradus tumora.

U ovoj studiji je proučeno ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS u trajanju od 60 meseci. Najkraće vreme preživanja je iznosilo 8 a najduže 60 meseci. Obzirom da je preživljavanje takvo da je ukupno preživljavanje 52,2%, medijanu nije moguće izračunati, a prosečno preživljavanje iznosilo je 47,21 meseca. Stopa ukupnog preživljavanja se kretala od 92,5% posle 12 meseci, 73,1% posle 36 da bi na kraju perioda preživanja od 60 meseci iznosila 52,2%.

Analizom ekspresije proteina regulatora ćelijskog ciklusa i apoptoze u odnosu na kliničko-patološke parametre pacijenata sa RMS, pokazala je sledeće rezultate: ciklin A je korelirao sa histološkim tipom RMS ( $p=0,047$ ); različita ekspresija p57 je pokazivala statističku značajnost u odnosu na histološki tip ( $p=0,042$ ), gradus tumora ( $p=0,026$ ) i ishodom bolesti ( $p=0,021$ ); ekspresija survivina u tumorskim ćelijama RMS bila je citoplazmatska i jedarna, pri čemu je samo jedarna ekspresije ovog markera bila značajno povezana sa godinama pacijenata, histološkim tipom i gradusom tumora ( $p=0.009$ ,  $p=0.008$ ,  $p=0.010$ , redom); ekspresije nestina je pokazala statističku značajnost u odnosu na starost pacijenata ( $p=0,028$ ) i gradus tumora ( $p = 0,022$ ). Ostali ispitivani markeri nisu pokazivali statističku značajnu povezanost sa posmatranim kliničko-patološkim parametrima.

Analiza metilacionog statusa promotora gena *p16* bila je u saglasnosti sa imunohistochemijskom ekspresijom njegovog proteina. Prisustvo hipermetilacije promotora gena *p16* je detektovano samo u jednom slučaju. Gubitak funkcije *p16<sup>INK4A</sup>* nije nastao metilacijom promotora gena.

Od analiziranih markera uticaj na preživljavanje pacijenata imali su p57 ( $p=0,045$ ) i nestin ( $p=0,044$ ).

Univarijantnom regresionom analizom kao značajni prediktivni faktori bolesnika sa RMS izdvojili su se starost, histološki tip, gradus tumora, prisustvo regionalnih i udaljenih metastaza. Od ispitivanih markera jedino je p57 bio blizu konvencionalnog nivoa značajnosti. Multivarijantnom regresionom analizom nijedan od ispitivanih markera, kao ni metilacioni status promotora gena *p16*, se nije izdvojio kao nezavistan prognostički faktor za RMS.

## C) UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

U doktorskoj disertaciji pregledno i temeljno su upoređivani rezultati sa relevantnim nalazima drugih autora koji se bave kliničko-patološkim analizama RMS. Niska incidenca RMS rezultira malim brojem studija koje se bave analizom imunohistohemijske ekspresije proteina regulatora celijskog ciklusa i apoptoze u ovom tumoru. Pregled literature daje vrlo heterogene podatke o prognosti koje značajno pojedinih imunohistohemijskih i genetičkih parametara, pre svega zbog histološke heterogenosti, zatim zbog različitih veličina uzorka kao i zbog varijacija u tumačenju ekspresije nekih od ispitivanih markera.

Ukupno petogodišnje preživljavanje pacijenata sa RMS u ovoj studiji je iznosilo 52,2%. Nešto kraće preživljavanje, prikazali su Ferrari A i saradnici (45,7%) i Sultan I i saradnici (46%), za isti period praćenja. U literaturi postoje i podaci o dužem preživljavanju obolelih od RMS, tako da je petogodišnje preživljavanje u jednoj studiji iznosilo 56,9%, a u radu Hosoi i saradnika 61,5%.

Deo istraživanja koji se odnosi na prognostički značaj ciklina A pokazuje da povećana ekspresija korelira sa histološkim tipom tumora, što je u saglasnosti sa rezultatima iz literature. Na većim serijama bolesnika sa različitim histološkim tipovima sarkoma uočeno je da povećana imunoreaktivnost korelira sa gradusom tumora i lokalizacijom, pojavom lokalnih recidiva, kao i sa tumorima kod kojih postoje genetske abnormalnosti (pozitivni fuzioni status).

Korelacija između imunohistohemijske ekspresije ciklina D1 i kliničko-patoloških parametara u literaturi prikazuju različite značajke. Veliki broj studija pokazuje udruženu povećanu ekspresiju ciklina D1 sa kliničko-patološkim parametrima u malignim tumorima različitog fenotipa, i dokazuju da ona ima značajnu ulogu u tumorogenzi, progresiji i metastaziranju. Rezultati ove studije pokazuju da ekspresija ciklina D1 u odnosu na kliničko-patološke parametre RMS, nije bila statistički značajna. Jedino je primarna lokalizacija tumora bila blizu konvencionalnog nivoa značajnosti.

Nivo ekspresije p57 varira tokom embriogeneze i diferencijacije, kao i u različitim fazama celijskog ciklusa. Ekspresija p57 opada ili se uopšte ne može detektovati kod nekih adultnih organa. Međutim, skeletni mišići, srce, mozak, pluća, bubreg, pankreas i testis su tkiva koja su zadržala i pokazuju difuznu ekspresiju ovog proteina u adultnom dobu. Pored značajke p57 u celijskom ciklusu, novija istraživanja pokazuju da se radi o multifunkcionalnom proteinu, koji učestvuje u regulaciji brojnih procesa, a koji mogu biti poremećeni u tumorogenezi.

U odnosu na analizirane kliničko-patološke parametre imunohistohemijska ekspresija p57 je korelirala sa histološkim tipom i gradusom tumora, kao i sa ishodom bolesti. Najveći broj ARMS i pleomorfni RMS je pokazivao patološku ekspresiju p57, pa je i u odnosu na gradus najveći broj visoko gradusnih tumora imao ovaj vid ekspresije. Pacijenti sa smrtnim ishodom su već imali aberantnu ekspresiju ovog markera. Od ostalih ispitivanih parametara RMS, patološka ekspresija je bila blizu konvencionalnog nivoa značajnosti u odnosu na starost pacijenata i veličinu tumora. Analizom ekspresija p57 u odnosu na ukupno preživljavanje pacijenata sa RMS, uočeno je statistički značajna razlika, bolesnici sa patološkom ekspresijom su imali kraće preživljavanje. Slično rezultatima ovog istraživanja Fan i saradnici su ispitali razliku u ekspresiji p57 u premalignim i malignim oralnim lezijama i pokazali da je ona značajna

zmanjena u planocelularnom karcinomu. Tako e, ovi autori isti u zna ajnu povezanost smanjene ekspresije ovog proteina sa ve im dimenzijama tumora, pojavom metastaza i višim klini kim stadijumom. Ovaj vid ekspresije je bio u korelaciji sa histološkim tipom i pojavom metastaza i kod ne sitno elijskih karcinoma plu a, karcinoma pankreasa, ovarijuma, kože i drugih.

Uloga proteina p16 u genezi neoplazmi je kontroverzna. Abnormalna ekspresija proteina p16 je identifikovana u razli itim humanim malignitetima. Samo je nekoliko studija ispitivalo zna aj ekspresiju ovog antitela u mezenhimalnim neoplazmama. Takahashi Y i saradnici, su prikazali poreme enu (manje od 50% pozitivnih jedara) ekspresiju p16 u RMS u 66,6% slu ajeva RMS, i to eš e kod ARMS u odnosu na ERMS. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su prikazali Gao i saradnici, gde je gubitak ekspresije p16 bio kod 38,3% ispitivanih slu ajeva RMS, i to eš e kod ARMS (47). Poreme ena ekspresija p16 je prikazana u 94% slu ajeva mekotkivnih sarkoma. Ova studija je obuhvatila i 19 slu aejava RMS, od kojih je samo kod jednog bila o uvana ekspresija.

Tako e, veliki broj autora je dokazo gubitak funkcije *p16INK4A* u RMS. Naj eš i mehanizmi koji dovod do ispada funkcije ovog gena su delecija ili metilacije INK4A promotera, pri emu dolazi do izbegavanja senescencije, što bi moglo predstavljati rani onkogeni doga aj. Me utim, rezultati prikazani u disertaciji pokazuju da p16 nema prognosti ki zna aj kod RMS

Svojestvo malignih elija da se odupru apoptotskim signalima može uticati na agresivnost i prognozu tumora. Veliki broj studija prikazuje rezultate ekspresije faktora apoptozne signalizacije, koji uti u na apoptoznu otpornost tumorskih elija ili elijskih linija u in vitro uslovima ili na životinjskim modelima. Tako e, dokazano je i da promenljiva intracelularna lokalizacija survivina u tumorima (citoplazmatska i nuklearna) može biti indikator aktivnosti survivina i može biti prognosti ki marker u nekoliko tipova tumora..

Odnos izme u citoplazmatske ekspresije survivina i posmatranih klini ko-patoloških parametara u ovom radu nije pokazao statisti ki zna aj. Rezultati su u skladu sa studijom koja je obuhvatale slu ajeve sa akutnom mijeloidnom leukemijom, gde nije na ena korelacija izme u jedarne i citoplazmatske ekspresije ovog markera i klini kopatoloških faktora. Suprotno, poreme ena ekspresija survivina u urotelijalnom karcinomu, bez obzira na subcelularnu lokalizaciju, je eš e bila prisutna kod viših stadijuma, lošije diferentovanih tumora i slu ajeva sa metastazom u regionalnim limfnim vorovima.

Do danas je objavljen veliki broj radova koji ukazuju da bi nuklearna lokalizacija survivina mogla imati uticaj na proliferaciju tumorskih elija. I u ovoj studiji se ukazuje da je nuklearna lokalizacija survivina zna ajno povezana sa godinama pacijenata sa RMS, histološkim tipom i gradusom tumora. Aberantna ekspresija je eš e bila prisutna kod pacijenata starijih od 18 godina, kod tumora visokog gradusa i pleomorfno histološkog tipa. Ovakav nalaz je u skladu sa rezultatima studija na RMS, osteosarkomu, ne-sitno elijskim karcinomima plu a, mantle elijskom limfomu, karcinomom želuca, neuroblastomu i drugim humanim malignitetima.

Autor je analiziraju i pove anu ekspresiju nestina u odnosu na posmatrane klini ko-patološke parametre, dobio statisti ku zna ajnost u odnosu na starost pacijenata i gradus tumora. Naime, kod pacijenata iz mla e starosne grupe i tumora niskog gradusa eš e je bila uo ena pove ana ekspresija. Samo nekoliko studija do sada je analiziralo ekspresiju nestina u RMS, pri emu je pokazana izražena pozitivnost ovog proteina u ve ini ERMS i ARMS. Me utim, nijedno od navedenih ispitivanja nije oobuhvatalo i pleomorfni histološki tip RMS. Tako e, ove studije nisu ispitivale povezanost ekspresije nestina i utvr enih prognosti kih parametara (kao što je primarna lokalizacija, veli ina tumora, prisustvo udaljenih metastaza, starost i histološki tip), kao ni njenu povezanost sa preživljavanjem pacijenata sa RMS. Suprotno našim rezultatima,

u nekim tumorima je dokazana povezanost izme u aberantne ekspresije nestina i lošije diferentovanosti tumora, kao i stadijuma bolesti.

Rezultati prikazani u disertaciji pokazuju da preživljavanje pacijenata korelira sa ekspresijom p57 i nestina, dok pozitivnost na ciklin A, ciklin D1 i survivin nije značajna za preživljavanje. Bolesnici sa patološkom ekspresijom p57 su imali kraće preživljavanje. Povećana ekspresija nestina je uočena kod pacijenata sa dužim preživljavanjem. U suprotnosti sa ovim rezultatima, u literaturi je prikazano da je povećana ekspresija nestina povezana sa kraćim preživljavanjem kod 152 pacijenta sa malignim melanomom. Slični rezultati su pokazani i kod pacijenata sa gliomom, ne-sitno eliskim karcinomom pluća, karcinomom ovarijuma. Ispitujući uticaj ekspresije proteina p57 na preživljavanje pacijenata u 64 slučajeva akutne limfocitne leukemije, dokazano je da duže preživljavanje imaju slučajevi sa pozitivnom ekspresijom ovog proteina. Ukupno petogodišnje preživljavanje je bilo duže kod slučajeva oralnog karcinoma sa difuznom izraženom ekspresijom p57, kao i kod pacijenata sa hepatocelularnim karcinomom. Genetske studije koje su ispitivale metilacioni status p57<sup>KIP2</sup> kod difuznog B-krupno-elijskog limfoma pokazuju iste rezultate u odnosu na preživljavanje pacijenata.

Primena multivarijantne regresione analize, u ovoj disertaciji je prikazano da su nezavisni prediktori preživljavanja pacijenata sa RMS veličina tumora, zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa i prisustvo udaljenih metastaza.

#### **D) OBJAVLJENI ILI SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO TEZE**

##### **Rad u časopisu indeksiranom u CC/SCI:**

Glumac S, Pejić S, Kovacević R, Dundžerović D, Davidović R, Ristić D, Sopta J. "Immunohistochemical expression of nestin in rhabdomyosarcoma: implications for clinicopathology and patient outcome" *Genet. Mol. Res.* DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015>. (Article in press).

## E) ZAKLJUČAK (OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE)

Doktorska disertacija pod naslovom „**Značaj poremećaja gena regulatora elijskog ciklusa i ekspresije njihovih proteina u rabdiosarkomu**“ dr Sofije Glumac, se odnosi na ispitivanje imunohistohemijskih i genetičkih parametara značajnih za prognozu ovog tumora. Analiza regulatora elijskog ciklusa, apoptoze i epigenetičkih promena u odnosu na kliničko-patološke karakteristike rabdiosarkoma sprovedena je po prvi put u našoj zemlji, i to na velikoj grupi bolesnika primenom metode tkivnog mikroniza. Rezultati izneti u ovoj doktorskoj disertaciji nedvosmisleno predstavljaju originalan doprinos istraživanjima o rabdiosarkomu, a u cilju boljeg razumevanja njegove patogeneze.

Komisija zaključuje da je istraživanje sprovedeno u skladu sa najvišim metodološkim standardima, uz integrisan kliničko-patološki pristup problemu. Disertacija je napisana jasno, rezultati detaljno izneti, ciljevi i zaključci jasno definisani, uz obiman literaturni pregled i kritički osvrt na svoja i tuđa iskustva.

Na osnovu navedenog, Komisija smatra da doktorska disertacija predstavlja originalni naučni doprinos i predlaže Naučnom odboru da prihvati priloženu disertaciju asist. dr Sofije Glumac i odobri njenu javnu odbranu.

U Beogradu, 09.11.2015. godine

Mentor

Članovi Komisije:

\_\_\_\_\_  
Prof. dr Jelena Sopta, vanredni profesor

\_\_\_\_\_  
Prof. dr Jovan D. Vasiljević, redovni profesor

\_\_\_\_\_  
Prof. dr Gordana Basta, redovni profesor

\_\_\_\_\_  
Prof. dr Vera Bunjevački, redovni profesor

\_\_\_\_\_  
Doc. dr Sanja Radojević-Škodrić, docent

\_\_\_\_\_  
Prof. dr Dragoljub Baceti, profesor u penziji