

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04.2016. godine, broj 5940/4 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije kandidata dr Martina Bosi , asistenta na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod nazivom:

„Ekspresija proteina visoke mobilnosti grupe a (HMGA) i njihovih modulatora u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože”

Mentor doktorske disertacije je prof. dr Dimitrije Brašanac, redovni profesor na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Jasmina Markovi Lipkovski, Institut za patologiju Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Milica Labudovi -Borovi , Institut za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Doc. dr Slaviša uri i , Katedra za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Banja Luci

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicnskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Martine Bosi pod nazivom **„Ekspresija proteina visoke mobilnosti grupe a (HMGA) i njihovih modulatora u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože”** napisana je na 98 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija,

zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 25 tabela i 14 slika. Sadržaj doktorske teze, zahvalnica i sažetak na srpskom i engleskom jeziku su prikazani na početku, dok se spisak skraćenica koristi u tekstu, biografija kandidata i prilozi nalaze na njenom kraju.

Uvod je napisan na 28 strana i sadrži šest slika i osam tabela. Podeljen je na osam poglavlja, koja su napisana jasno i koncizno. U prvih četiri poglavlja su opisane kliničke i histopatološke karakteristike aktinoidne keratoze (AK), Bowen-ove bolesti (BD) i planocelularnog karcinoma kože (SCC), principi njihovog nastanka, kao i molekulske promene koje se javljaju u procesu kancerogeneze i nastanka ovih tumora kože. Peto poglavlje je posvećeno strukturi hromatina i epigenetskoj regulaciji transkripcije gena, koje su jasno i koncizno opisane, sa kratkim osvrtom na HMGA proteine, uz tabelarni prikaz i ilustraciju jednom slikom. Šesto poglavlje je posvećeno HMGA proteinima i sadrži dve slike i jednu tabelu. Opisana je struktura ove familije proteina, mehanizam njihovog dejstva i regulacije njihove aktivnosti, zatim uloga u razvoju normalnih tkiva i organa, odnosno tumora, kao i njihov dijagnostički značaj. U sedmom poglavlju opisani su proteini familije Protein arginin metiltransferaza, PRMT1 i PRMT6. Jasno i sažeto je opisana njihova struktura, mehanizmi dejstva i uloga u razvoju tkiva i organa, kao i kancerogenezi. Ovo poglavlje sadrži i dve slike i jednu tabelu. U osmom poglavlju su opisane acetil transferaze p300 i PCAF, njihova uloga u razvoju organa i kancerogenezi, kao i odnos sa HMGA proteinima.

Ciljevi istraživanja, napisani na jednoj strani, su jasno definisani, pri čemu su izdvojena četiri glavna cilja: 1. Ispitivanje ekspresije HMGA1a/1b, HMGA2, PRMT1, PRMT6, PCAF i p300/CBP u aktinoidnoj keratozi, Bowen-ovoj bolesti i invazivnom planocelularnom karcinomu kože; 2. Analiza ispoljavanja HMGA proteina i njihovih modulatora u in situ lezijama klasifikovanim kao keratinocitna intraepidermalna neoplazija (KIN); 3. Korelacija ekspresije HMGA proteina i njihovih modulatora sa prognostičkim parametrima planocelularnog karcinoma kože – dimenzije, dubina invazije, debljina i gradus tumora; 4. Procena različitih načina evaluacije imunohistohemijskog bojenja i ekspresije HMGA proteina i njihovih modulatora u odnosu na tip lezije i prognostičke parametre.

Poglavlje **Materijal i metode** je napisano na devet strana i sadrži podatke o analiziranom uzorku, metodi konstrukcije tkivnog mikroniza, primenjenim metodama imunohistohemijskog i dvostrukog imunofluorescentnog bojenja i načinima njihove analize, i statističkoj obradi rezultata.

Detaljno je objašnjena tehnika konstrukcije tkivnog mikroniza, na čijim presecima su rađena imunohistohemijska bojenja sledećim primarnim antitelima: HMGA1a/1b, HMGA2, PRMT1, PRMT6, p300, PCAF, E-kaderin, vimentin i matriksna metaloproteinaza 9 (MMP9). U ovom poglavlju je opisana i metodologija analize obojenih preseka za svako primenjeno antitelo. Analiziran je broj pozitivnih ćelija (semikvantitativno) i distribucija tumorskih ćelija u tumorskim plažama. Za istraživanje je korišćen biopsijski materijal pacijenata sa AK, BD i SCC kože koji su hirurški tretirani i dijagnostikovani u periodu od 2002. do 2012. godine. Takođe je ispitivana korelacija prognostičkih parametara SCC kože (stepen diferentovanosti, dijametar, debljina, dubina invazije) sa imunohistohemijskim markerima (HMGA1a/1b, HMGA2, PRMT1, PRMT6, p300 i PCAF). Ovo poglavlje je upotpunjeno jednom slikom i sa tri tabele.

Poglavljje **rezultati** je napisano na 27 strana i u njemu su navedeni originalni podaci dobijeni u ovom istraživanju. Rezultati su pregledno i sistematično predstavljani kroz 13 tabele i sedam slika, uz potrebna objašnjenja u pratećem tekstu, i sistematizovani u skladu sa ciljevima istraživanja.

Diskusija je napisana jasno i pregledno na deset strana, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

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

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 173 bibliografske jedinice, koje su poređane po redosledu po kome se citiraju u tekstu disertacije.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati se odnose na 307 pacijenata sa biopsijama tumora kože, koje su na osnovu histopatološke dijagnoze grupisane u 90 slučajeva AK, 50 BD i 167 SCC.

Ekspresija HMGA1a/1b proteina je bila odsutna ili niska u većini ispitanih slučajeva. Prisustvo HMGA1a/1b u SCC kože sugeriše na ulogu ovog proteina u nastanku invazivnog SCC. Niska ekspresija i odsustvo razlika između AK i BD, kao i KIN različitog stepena ukazuje da HMGA1a/1b nema bitnu ulogu u nastanku preinvazivnih lezija epidermisa različitog stepena. Viša ekspresija HMGA1a/1b u slabo diferentovanim tumorima sugeriše negativnu ulogu ovog proteina u dediferencijaciji i progresiji tumora.

Viša i difuzna ekspresija HMGA2 u SCC nego u in situ lezijama sugerišu značaj aktivacije ovog proteina u nastanku invazivnog tumora. Niži obim ekspresije HMGA2 u KIN lezijama niskog gradusa i varijabilna distribucija ekspresije ovog proteina u in situ lezijama govori u prilog njihove heterogenosti u pogledu ekspresije HMGA2 proteina i sugerišu njegovu ograničenu ulogu u progresiji in situ lezija iz nižeg u viši stepen. Razlike u distribuciji, ali ne i obimu ekspresije HMGA2 u odnosu na stepen diferentovanosti SCC, kao i odsustvo razlika u ekspresiji u odnosu na druge prognostičke parametre SCC sugerišu ulogu u progresiji tumora u smislu dediferencijacije, ali ne i razvoja invazivnog fenotipa.

Viša i difuzna ekspresija PRMT1 u BD i SCC uz sniženje ekspresije u slabije diferentovanim tumorima ukazuju na značaj aktivacije PRMT1 u nastanku in situ i inazivnog SCC kože, ali i na varijacije u ekspresiji ovog proteina. Takve varijacije bi mogle biti posledica složenih poremećaja u funkcionisanju njegovih brojnih molekularnih partnera. Suprotan smer varijacija ekspresije PRMT6 u ispitanim lezijama sugeriše značaj aktivacije PRMT6 u progresiji SCC kože. Takođe, kao i u slučaju PRMT1, varijacije u ekspresiji PRMT6 bi mogle biti posledica složenih poremećaja u funkcionisanju njegovih brojnih molekularnih partnera.

Nalazi značajno više i češće difuzne jedarne ekspresije p300 u SCC, kao i češće difuzne jedarne ekspresije ovog proteina u slabije diferentovanim tumorima, debljim tumorima i onim sa dubljom invazijom sugerišu ulogu aktivacije p300 kako u nastanku, tako i u dediferencijaciji i progresiji SCC kože. Udruženost visoke ekspresije p300 i aberantne ekspresije vimentina u SCC kože ukazuje na ulogu u epitelno-mezenhimnoj transformaciji kao mehanizmu progresije ovog tumora. Prisustvo citolazmatske ekspresije PCAF u većini ispitanih slučajeva ukazuje na rani poremećaj funkcije ovog proteina u kancerogenezi u epidermisu. Dodatno, gubitak jedarne ekspresije PCAF u SCC, kao i difuzna citoplazmatska ekspresija ovog proteina u SCC, naročito u slabije diferentovanim tipovima, govore u prilog izmenjene funkcije PCAF koja za posledicu ima poremećaj sazrevanja ćelija tj. dediferencijaciju.

Udruženo prisustvo HMGA1a/1b, odnosno njegove povišene ekspresije i visoke ekspresije PRMT1 u SCC kože sugerišu značaj koekspresije HMGA2 i PRMT1 u nastanku invazivnog SCC kože. Dalje, udružena povišena ekspresija HMGA2 i visoka ekspresija p300 u AK ukazuju na značaj koekspresije HMGA2 i p300 u ranoj kancerogenezi u epidermisu.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U doktorskoj disertaciji je uinjena iscrpna i pregledna komparacija dobijenih rezultata sa relevantnim literaturnim podacima drugih autora koji se bave proučavanjem poremećaja opisanih proteina i ulogom u kancerogenezi. Većina dosadašnjih istraživanja je bila sprovedena na SCC i njihovim prekursorima na drugim lokalizacijama, osim u slučaju proteina p300, kada su ispitivani samo invazivni SCC kože, ali ne i in situ lezije (Chen i saradnici, 2014).

Prisustvo ekspresije HMGA1a/1b je u ovom istraživanju bilo veće u invazivnom SCC kože nego u in situ lezijama. Ranije je pokazana viša ekspresija ovog proteina u invazivnom SCC grlišta materice u porecnoj sa različitim stepenom cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN), kao primera displazije u slojevitim epitelima (Bandiera i saradnici, 1998). Iako je u CIN lezijama pokazano povećanje ekspresije HMGA1a/1b sa progresijom displazije, u ovom istraživanju to nije uočeno u CIN lezijama. Kao moguć mehanizam nastanka povišene ekspresije HMGA1a/1b u SCC kože naveden je poremećaj Wnt/β-katenin signalnog puta, koji je već pomećen u opisanim tumorima (Brasanac i saradnici, 2005). Iako je ekspresija HMGA1a/1b u invazivnim SCC kože bila veća, uočeno je paradoksalan nalaz smanjenja ekspresije sa dediferencijacijom tumora, kakav u literaturi, do sada, nije opisan.

U ovom istraživanju je uočena povišena ekspresija HMGA2 u invazivnom SCC u porecnoj sa in situ lezijama. Ranija istraživanja na tumorima kože su vršena u melanomima, u kojima je ekspresija ovog proteina bila povišena u porecnoj sa benignim nevusima (Raskin i saradnici, 2013). Ovo istraživanje je pokazalo i varijabilnu ekspresiju HMGA2 u in situ lezijama u pogledu obima i distribucije. Difuzna, ali i ekspresija HMGA2 varijabilnog obima je uočena u displazijama nastalim na terenu skvamozne metaplazije bronha (Sarhadi i saradnici, 2006). U skladu sa literaturnim podacima o ekspresiji HMGA2 u SCC usne duplje je i prikazano odsustvo razlika u ekspresiji ovog proteina u odnosu na prognostičke parametre SCC kože (diferentovanost i dijametar) (Sterenczak i saradnici, 2014).

U ovom istraživanju je pokazan porast ekspresije PRMT1 u invazivnom SCC kože u porecnoj sa in situ lezijama, ali i paradoksalno smanjenje ekspresije u slabo diferentovanim tumorima u porecnoj sa bolje diferentovanim. Slično, nešto niža ekspresija PRMT6 je uočena u invazivnom SCC kože u porecnoj sa in situ lezijama, kao i neotekivano povećanje ekspresije u

slabo diferentovanim tumorima u pore enju sa bolje diferentovanim. Ovakve varijacije ekspresije PRMT1 i PRMT6 nisu opisane u literaturi. Kao objašnjenje njihovog značaja ponuđeno je moguće interakcije ovih proteina sa E-kaderinom i MMP9. Njihova interakcija je ranije opisana u drugim tumorima (Avasarala i saradnici, 2015; Cha i saradnici, 2011; Kim i saradnici, 2013) ali upotrebom imunohistohemijskih metoda u ovom istraživanju nije pokazana njihova korelacija.

Povišena ekspresija p300, koja je u ovom istraživanju uočena u invazivnom SCC kože u pore enju sa in situ lezijama, je nalaz koji je suprotan nalazu u melanomima i displastnim melanocitnim nevusima (Rotte i saradnici, 2013). U ovom istraživanju su potvrđeni nalazi Chena i saradnika da obim ekspresije p300 ne korelira sa dijametrom, debljinom i stepenom diferentovanosti SCC kože, ali je uočeno da je difuzna distribucija imunopozitivnosti u tumorskim plazama udružena sa većom debljinom tumora i njihovom dubljom invazijom. Gubitak jedarne ekspresije, kakav je u ovom istraživanju uočeno u SCC kože, ranije je pokazan i u drugim malignim tumorima (Ying i saradnici, 2010). Međutim, za razliku od SCC kože, taj gubitak je korelirao sa dijametrom tumora, njegovom diferentovanošću i dubinom invazije. Pojava citoplazmatske ekspresije PCAF u većini ispitanih slučajeva kakva je uočena u ovom istraživanju, ranije nije opisana i uglavnom je postojao i njen gubitak, nastao kao posledica metilacije promotorskog regiona gena (Zhu i saradnici, 2009).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Bosic M, Brasanac DC, Stojkovic-Filipovic JM, Zaletel IV, MD, Gardner JM, Cirovic SL. Expression of p300 and p300/CBP associated factor (PCAF) in actinic keratosis and squamous cell carcinoma of the skin. *Exp Mol Pathol* 2016; 100:378-385. M21, IF 2,706

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija dr Martine Bosi, pod nazivom „**Ekspresija proteina visoke mobilnosti grupe a (HMGA) i njihovih modulatora u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože**” predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju progresije preinvazivnih lezija keratinocita kao i sticanja karakteristika invazivnog planocelularnog karcinoma povezanih sa potencijalno agresivnijim biološkim ponašanjem.

Komisija zaključuje da je istraživanje sprovedeno u skladu sa najvišim standardima naučno-istraživačkog rada. Disertacija je napisana jasno, ciljevi su precizno definisani, rezultati pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, uz odgovarajuće tabelarne prikaze u slikama, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, Komisija predlaže Naučnom vešću u Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Martine Bosi i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 25.05. 2016.

Članovi Komisije:

Prof. dr Jasmina Marković -Lipković

Doc. dr Milica Labudović -Borović

Doc. dr Slaviša Čurić

Mentor:

Prof. dr Dimitrije Brašanac
