

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 09.07.2018. godine broj 5940/17-JT, imenovana je Komisija za ocenu završne doktorske disertacije kandidata dr Jovanke Trifunović, specijaliste patološke anatomije, pod nazivom „**Značaj ispitivanja proliferativnih markera ciklina A i Ki-67 i telomeraze u karcinomu bubrežnih ćelija**“. Mentor doktorske disertacije je Prof. dr Gordana Basta-Jovanović, a Komentor je Prof. dr Ivana Novaković.

Članovi Komisije za ocenu završene doktorske disertacije su:

1. Prof. dr Miodrag Lazić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu,
2. Prof. dr Momčilo Ristanović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu,
3. Prof. dr Radoslav Gajanin, profesor Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci, BiH.

Članovi Komisije su detaljno proučili priloženu doktorsku disertaciju i podnose Naučno-nastavnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Jovanke Trifunović „**Značaj ispitivanja proliferativnih markera ciklina A i Ki-67 i telomeraze u karcinomu bubrežnih ćelija**“, napisana je na 178 strana i sadrži 40 tabela, 29 slika i 51 grafikon. Podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. Doktorska disertacija je napisana na srpskom jeziku i sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

Poglavlje **UVOD** sadrži 54 strane, a podeljeno je u 15 podnaslova. Detaljno su prezentovani podaci o karcinomu bubrežnih ćelija (RCC), koji uključuju incidencu, starosnu i polnu distribuciju, etiologiju, kliničku prezentaciju, dijagnostiku, makroskopski i histopatološki izgled tumora, kao i prognostičke faktore. Takođe, dat je prikaz i aktuelne histološke klasifikacije tumora bubrega određene prema Klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO), TNM klasifikacija tumora bubrega i histopatološki stepen ćelijske anaplazije karcinoma bubrežnih ćelija po Fuhrmanu. Naglašena je uloga ćelijskog ciklusa, markera proliferativne aktivnosti malignih tumora: ciklina A i Ki-67 i telomeraze.

Tekst uvoda je upotpunjen sa 24 slike i 3 tabele.

Poglavlje **CILJEVI ISTRAŽIVANJA** su precizno definisani i izdvojeni u 6 glavnih ciljeva:

1. Imunohistohemijsko ispitivanje intenziteta ekspresije ciklina A kod RCC i analiza korelacije ekspresije ciklina A sa kliničko-morfološkim karakteristikama RCC (stadijumom tumora, nuklearnim gradusom tumora, histopatološkim tipom, veličinom tumora i preživljavanjem (u mesecima);
2. Imunohistohemijsko ispitivanje intenziteta ekspresije Ki67 kod RCC i analiza korelacije ekspresije Ki67 sa kliničko-morfološkim karakteristikama RCC (stadijumom tumora, nuklearnim gradusom tumora, histopatološkim tipom, veličinom tumora i preživljavanjem (u mesecima);
3. Imunohistohemijsko ispitivanje intenziteta ekspresije telomerase kod RCC i analiza korelacije ekspresije telomerase sa kliničko-morfološkim karakteristikama RCC (stadijumom tumora, nuklearnim gradusom tumora, histopatološkim tipom, veličinom tumora i preživljavanjem (u mesecima);
4. Analiziranje promotorskog regiona hTERT gena i detektovanje prisustva mutacija i polimorfizma -245T>C kod ispitivanih pacijenata sa RCC;
5. Analiziranje prisustva genske amplifikacije u promotorskom regionu hTERT gena kod ispitivanih pacijenata sa RCC, kao i povezanost između hTERT amplifikacije i epidemioloških, kliničkih i patoloških nalaza;
6. Analiziranje metilacionog statusa promotorskog regiona hTERT gena kod ispitivanih pacijenata sa RCC.

Poglavlje **MATERIJAL I METOD** je napisan na 14 strana. Za izradu doktorske disertacije korišćen je operativni materijal pacijenata sa RCC, dobijen parcijalnom nefrektomijom na Klinici za urologiju Kliničkog centra Srbije i Kliničko-bolničkom centru „Dr Dragiša Mišović“, a dijagnostikovano na Institutu za Patologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu u periodu od 2010. do 2013. godine. Za obrađeni materijal postoji odobrenje Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije (KCS) i Kliničko-bolničkom centra „Dr Dragiša Mišović“. Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom.

Analizirani su sledeći kliničko-morfološki podaci: pol, godine starosti, stadijum tumora, nuklearni gradus tumora, histopatološki tip tumora, veličina (dimenzije) tumora i preživljavanje (u mesecima).

Metodološki pristup objašnjen je u posebnim odeljcima: Histopatološka obrada uzorka tkiva tumora, Imunohistohemijske metode, Molekularno-genetička istraživanja. Poslednji odeljak ovog poglavlja odnosi se na korišćenje statističke metode u obradi podataka. Prilikom statističke obrade podataka korišćen je IBM SPSS 20.0 softverski paket.

U ovoj studiji operativni materijal pacijenata sa RCC, posle obrade i kalupljenja, najpre je obojen hematoksilin-eozinom (H&E), potom postavljena histopatološka dijagnoza RCC i rađene su imunohistohemijske metode. Imunohistohemijsko bojenje izvršeno je pomoću primarnih antitela specifičnih za ciklin A, Ki-67 i telomerazu na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Kasnije su rađena i molekularno-genetička istraživanja u saradnji sa Laboratorijom za genetiku Instituta za Neurologiju KCS i Laboratorijom za genetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu.

Tekst je upotpunjen sa 2 slike i 2 grafikona.

Originalni podaci koji su dobijeni u ovom istraživanju izneti su u poglavlju **REZULTATI**, koje sadrži 62 strane. Rezultati su pregledno i sistematično predstavljani u formi 42 tabele, 48 grafikona i 3 slike, a sistematizovani su u skladu sa postavljenim ciljevima.

Poglavlje **DISKUSIJA** dobijenih rezultata napisana je jasno i pregledno na 20 strana. Na detaljan način analizirani su dobijeni rezultati. Prikazani su podaci drugih studija sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. Poglavlje Diskusija podeljeno je u 4 dela: a) analiza kliničko-morfoloških parametara kod pacijenata sa RCC; b) imunohistohemijska ekspresija ciklina A u RCC; c) imunohistohemijska ekspresija Ki67 u RCC; d) imunohistohemijska ekspresija telomerase u RCC i d) analiza genetičkih rezultata.

Poglavlje **ZAKLJUČCI** je izneto na 2 strane u formi jasno definisanih konstatacija, redosledom koji odgovara postavljenim ciljevima.

U poglavlju **LITERATURA** citirano je 294 bibliografskih jedinica iz referentnih međunarodnih i domaćih časopisa i relevantnih poglavlja iz udžbenika.

B) OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati se odnose na 74 pacijenta sa dijagnozom RCC. Većina pacijenata, njih 48 (64,9%) je muškog pola, prosečne starosti 59.27 ± 10.25 godina. Kod 25 (33,8%) pacijenata tumor je bio veličine od 40,1 do 60,0 mm. Prosečno preživljavanje pacijenata kretalo od 11 do 58 meseci ($37,65 \pm 12,6$). Tumori nižeg stadijuma dijagnostikovani su kod 42 (56,8%) pacijenta. Niži gradus

tumora je dijagnostikovano kod 41 (55,4%) pacijenta, dok je viši gradus dijagnostikovano kod 33 (44,6%) pacijenta. Svetloćelijski histopatološki tip RCC je bio najzastupljeniji, kod 49 (66,2%) pacijenata.

Imunohistohemijska ispitivanja ekspresije ciklina A u tkivu RCC pokazala su da postoji statistički značajna razlika ekspresije ciklina A kod različitih histopatoloških tipova RCC. Najintenzivnija ekspresija ciklina A uočena je u slučajevima papilarnog histopatološkog tipa (u odnosu na hromofobni i svetloćelijski histopatološki tip što bi ukazalo na njegov prognostički značaj).

Korelacionom analizom nije nađena povezanost između ekspresije ciklina A i stadijuma tumora, nuklearnog gradusa tumora, starosti pacijenata, veličine tumora i vremena preživljavanja pacijenata.

Imunohistohemijska ispitivanja ekspresije Ki67 u tkivu RCC pokazala su da je dobijena statistički značajna razlika jedino između histopatološkog tipa tumora, tj. kod papilarnog RCC dobijena je izrazita pozitivnost u odnosu na preostala dva analizirana histopatološka tipa RCC, što ukazuje na najnepovoljniju varijantu ovog tipa RCC.

Razlika u ekspresiji Ki67 u odnosu na stadijum tumora, veličinu tumora, starost pacijenata i vreme preživljavanje pacijenata, nisu pokazala statističku značajnost.

Razlika po nuklearnom gradusu tumora je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti od 0,05, pa je treba uzeti u razmatranje jer je moguće da bi na većem uzorku dobili značajniju razliku.

Imunohistohemijska ispitivanja ekspresije telomeraze u tkivu RCC su pokazala da su vrednosti ekspresije telomeraze vrlo slične kada je u pitanju pol, starost pacijenata, nuklearni gradus tumora, stadijum tumora, veličina tumora i vreme preživljavanja pacijenata.

Evidentna je razlika zapažena između histopatoloških tipova tumora, i to u korist papilarnog histopatološkog tipa, kod koga je ekspresija telomeraze drastično veća u odnosu na ostala dva histopatološka tipa, što takođe ukazuje na najnepovoljniju prognozu ovog histopatološkog tipa.

Sekvenciranjem 343 bp dugog segmenta u okviru promotorskog regiona hTERT gena, koji se proteže od pozicije -278 do +65, nije pokazano prisustvo mutacija ni u jednom od ispitivanih uzorka RCC.

Sekvenciranjem je ipak otkriveno prisustvo tranzicije T/C na poziciji -245 bp (polimorfizam pojedinačnog nukleotida koji u bazama podataka nosi oznaku rs2853669).

Od 54 analizirana slučaja pacijenata sa RCC, mutirani alel bio je prisutan u homozigotnom obliku (CC) u samo 7,4%, a u heterozigotnom obliku (CT) u 40,7%, dok je preostalih 51,9% bilo homozigotno za nemutirani tip gena (wt alel). Verovatnoća da se razvije RCC nižeg gradusa bila je 3 puta veća kod osoba koje su bile heterozigoti, nego kod onih sa nemutiranim genotipom (wt genotipom, TT).

Analizom hTERT gena na prisustvo genske amplifikacije kod ispitivanih pacijenata sa RCC, genska amplifikacija uočena je kod 19,4% pacijenata. Nije uočena povezanost između hTERT amplifikacije i epidemioloških, kliničkih i patoloških nalaza. Nivoi amplifikacije kretali su se u rasponu od 2.60 do 7.61.

Analizom metilacionog statusa promotorskog regiona hTERT gena kod ispitivanih pacijenata sa RCC, utvrđeno je da je hTERT promotor metilovan u 54,8% uzoraka. Značajna razlika zapažena je između histopatoloških tipova tumora, pošto je kod hromofobnog histopatološkog tipa RCC, kod svih 5 pacijenata hTERT promotor bio metilovan.

c) UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

U doktorskoj disertaciji pregledno i temeljno su upoređivani dobijeni rezultati sa relevantnim nalazima drugih autora koji su se takođe bavili analizom kliničko-morfoloških parametara kod pacijenata sa RCC. Analiza je obuhvatila distribuciju pacijenata u odnosu na pol, godine starosti, veličinu tumora, stadijum tumora, nuklearni gradus tumora, histopatološki tip tumora i preživljavanje pacijenata u mesecima. Rezultati prikazane studije su u saglasnosti sa rezultatima drugih studija (Protzel C i saradnici, Park JY i saradnici, Gayed BA i saradnici, Itoi T i saradnici, Wong PK i saradnici, Choe M i saradnici).

Niska incidenca RCC rezultira malim brojem studija koje se bave analizom imunohistohemijske ekspresije ciklina A i Ki67 i telomeraze u ovom tumoru. Pregled literature daje vrlo heterogene podatke o prognostičkom značaju pojedinih imunohistohemijskih i genetičkih parametara, pre svega zbog histološke heterogenosti i zbog varijacija u tumačenju ekspresije nekih od ispitivanih markera.

U ovoj prikazanoj studiji određivan je i prognostički značaj ciklina A i Ki67 i telomeraze, a rađena su i molekularno-genetička istraživanja.

U analizi u okviru disertacije ekspresija ciklina A kretala se od 0% do 70% pozitivnih ćelija. Odnos ekspresije ovog markera u odnosu na histopatološki tip RCC pokazao je statističku značajnost, za razliku od ostalih kliničko-patoloških parametara. Naime, pacijenti sa papilarnim RCC imali su veće srednje vrednosti ekspresije ciklina A u odnosu na hromofobni i svetloćelijski RCC. Prikazani rezultati su u saglasnosti i sa rezultatima iz literature (Kosacka M i saradnici, Dobashi Y i saradnici, Boström P i saradnici, Furihata M i saradnici, Engellau J, Poikonen P i saradnici, Davidson B i saradnici, Wolowiec D i saradnici).

U istraživanju u okviru disertacije ekspresija Ki67 kretala se od 0% do 30% pozitivnih ćelija. Odnos ekspresije ovog markera u odnosu na histopatološki tip RCC pokazao je statističku značajnost između papilarnog histopatološkog tipa RCC i preostala dva analizirana histopatološka tipa. I ovi rezultati su u saglasnosti i sa rezultatima iz literature (Jovanović MP i saradnici, Marković O i saradnici, Kramer E i saradnici, Szczuraszek K i saradnici, Rao S i saradnici, Jadali F i saradnici, Meurer RT i saradnici, Viswanathan V i saradnici).

Prikazana ekspresija telomeraze kretala se od 0% do 80% pozitivnih ćelija. U grupi pacijenata sa RCC koje su analizirali, ispitivanja imunohistohemijske ekspresije telomeraze su pokazala da su vrednosti ekspresije telomeraze vrlo slične kada je u pitanju pol pacijenata, nuklearni gradus tumora i stadijum tumora. Jedino je evidentna razlika između histopatoloških tipova tumora i to u korist papilarnog histopatološkog tipa kod koga je ekspresija telomeraze drastično veća od ostala dva histopatološka tipa tumora. Brojni rezultati iz literature su u saglasnosti sa prikazanim rezultatima u okviru ove disertacije. (Hiyama E i saradnici, Yang CT i saradnici, Rha SY i saradnici, Hoos A i saradnici, Papadopoulou A i saradnici, Meeker AK i saradnici, Hiyama E i saradnici, Loveday RL i saradnici, Baykal A i saradnici)

U okviru molekularno-genetičkih istraživanja, sekvencionisani su promotorski region hTERT gena kod 31 uzorka pacijenata obolelih od RCC i nije identifikovana ni jedna aktivacija mutacija na mestima na kojima se očekivalo. Postoji mali broj studija koje su se bavile mutacijama hTERT kod RCC, u kojima se došlo do zaključka da je pojava mutacija relativno retka, od 6 do 13% (Wang K i saradnici, Hosen I i saradnici, Casuscelli J i saradnici), što je u skladu sa rezultatima prikazanim u ovoj disertaciji. Mala učestalost hTERT mutacija kod RCC u oštroj je

suprotnosti sa rezultatima do kojih se došlo u studijama Nguyen D i saradnika i Zheng X i saradnika, a kod kojih se i do 100% slučajeva opažaju hTERT mutacije.

U disertaciji je dalje analizirana i učestalost genske amplifikacije i došlo se do zaključka da kod skoro 20% pacijenata obolelih od RCC postoji ova genska promena. Sličnu učestalost hTERT genske amplifikacije prikazali su i Diaz A i saradnici, i bila je u korelaciji sa lošom prognozom. Visoke vrednosti učestalosti hTERT amplifikacija (79%), opisali su Xie H i saradnici i kod njih prognoza takođe nije dobra.

U uzorku prikazanom u okviru disertacije, hTERT amplifikacija nije se pokazala dovoljno informativnom da bi se mogao predvideti ishod bolesti pošto nije bilo moguće ustanoviti nikakvu povezanost između te amplifikacije i ponašanja specifičnog ispitivanog tumora.

Metilacija promotera hTERT gena ranije nije istraživana kod različitih podtipova RCC. Istraživanje u okviru ove disertacije je prvo u kojem se posmatra moguća povezanost ove epigenetske pojave sa ponašanjem RCC. Interesantno je da je metilacija promotera hTERT gena bila čest slučaj, što ukazuje na značaj ovog mehanizma hTERT genske regulacije kod nekih podtipova RCC.

Učestalost metilacije promotera bila je 100%, što nije uobičajena pojava, ali jeste ranije opisana u slučajevima različitih tumora i različitih gena (Vinci S i saradnici, Haraguchi K i saradnici).

Izgleda da hTERT, putem metilacije svog promotera i polimorfizma funkcionalnog promotera ima svoju ulogu u biologiji karcinoma bubrežnih ćelija kod pacijenata u Srbiji. Da bi se ovi zaključci potvrdili potrebno je proučiti veći uzorak pacijenata.

D) OBJAVLJENI RADOVI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

1. **Trifunovic J.**, Prvanovic M., Jovanovic A., Dzamic Z., Lazic M., Ristanovic M. Radojevic-Skodric S., Basta-Jovanovic G. Immunohistochemical expression of proliferative markers in renal cell carcinoma. Journal of BUON. 2018; 23 (4)

(Article in press)

2. **Trifunovic J.**, Basta-Jovanovic G., Nikolic N., Carkic J., Marjanovic A., Brankovic M., Radojević- Skodrić S., Prvanovic M., Jovanovic A., Dzamic Z., Milasin J. HTERT promoter methylation and single nucleotide polymorphism (-245 T>C) affect renal cell carcinoma behavior in Serbian population. Journal of BUON. 2018; 23 (5)

(Article in press)

E) ZAKLJUČAK (OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE)

Doktorska disertacija pod nazivom „**Značaj ispitivanja proliferativnih markera ciklina A i Ki-67 i telomeraze u karcinomu bubrežnih ćelija**“ kandidata dr Jovanke Trifunović, se odnosi na ispitivanje imunohistohemijskih i molekularno-genetičkih parametara značajnih za prognozu ovog tumora. Analiza proliferativnih markera ciklina A i Ki-67 i telomeraze u karcinomu bubrežnih ćelija u odnosu na kliničko-morfološke karakteristike RCC sprovedena je po prvi put u našoj zemlji. Rezultati izneti u ovoj doktorskoj disertaciji nedvosmisleno predstavljaju originalan doprinos istraživanjima o karcinomu bubrežnih ćelija, a u cilju boljeg razumevanja njegove patogeneze i mogu biti korisni u daljem istraživanju karcinoma bubrežnih ćelija.

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

Na osnovu svega navedenog, Komisija smatra da doktorska disertacija predstavlja originalni naučni doprinos i predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati priloženu doktorsku disertaciju dr Jovanka Trifunović i odobri njenu javnu odbranu.

U Beogradu, 11.07.2018.

Članovi komisije:

Prof. dr Miodrag Lazić

Prof. dr Momčilo Ristanović

Prof. dr Radoslav Gajanin

Mentor:

Prof. dr Gordana Basta-Jovanović

Komentor:

Prof. dr Ivana Novaković
