

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16-TI, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Kliničke i epidemiološke karakteristike sindroma multiple endokrine neoplazije tip 1 i mehanizmi inaktivacije *MEN1* gena u tumorskim tkivima endokrinog i van endokrinog sistema“

kandidata dr Tatjane Isailović, zaposlene u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije. Mentor je Profesor dr Svetozar Damjanović

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Milan Petakov, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Ivana Novaković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Milica Medić Stojanoska, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Tatjane Isailović napisana je na ukupno 111 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, metodologija istraživanja, rezultati, diskusija, zaključak, ograničenja studije i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 20 tabela, 10 grafikona i 7 slika. Doktorska disertacija sadrži podatke o mentoru i komisiji, zahvalnicu, sažetak na srpskom i engleskom jeziku i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je definisano šta je sindrom multiple endokrine neoplazije tip 1 (MEN1), koji su kriterijumi za postavljanje dijagnoze, kao i epidemiološke i kliničke karakteristike sindroma. Detaljno su opisane kliničke karakteristike svih pojedinačnih (tumorskih) komponenti MEN1 sindroma, njihova učestalost u MEN1 sindromu, kao i metode za

dijagnozu i načine lečenja ovih tumora. Objasnjeno je i pojam MEN1 fenokopije i navedene najvažnije kliničke karakteristike do sada opisanih sindroma koji nalikuju multiploj endokrinoj neoplaziji tip 1. Koncizno i jasno, u tekstu i tabelarno, je prikazan način za postavljanje dijagnoze MEN1 sindroma, kao i smernice za doživotno praćenje pacijenata sa MEN1 sindromom. Opisano je mortalitet kao i uzroci smrti pacijenata sa MEN1 sindromom.

U posebnom poglavlju detaljno je opisana genetska osnova sindroma – lokacija i struktura *MEN1* gena, kao i mehanizmi inaktivacije *MEN1* gena. Detaljno su opisane do sada otkrivene mutacije u *MEN1* genu i dat tabelarni prikaz poznatih polimorfizama *MEN1* gena. Opisana je molekularna osnova sindroma, odn. na koji način disfunkcija glavnog produkta *MEN1* gena – proteina zvanog menin, dovodi do nastanka ovih tumora. Opisani su svi do sada poznati proteinski partneri menina, uz detaljan prikaz meninom regulisane genske transkripcije, reparacije DNK i ćelijskih signalnih puteva. Na kraju je dat opsežan prikaz literature na temu korelacije genotipa i fenotipa MEN1 sindroma odn. na koji način je klinička slika sindroma uslovljena genskim alteracijama *MEN1* gena.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja prevalencije MEN1 sindroma u našoj populaciji, analize kliničkih karakteristika pacijenata sa MEN1 sindromom, analiza mutacija *MEN1* gena u konstitutivnoj DNK i korelacije sa kliničkom slikom (analiza odnosa genotipa i fenotipa), kao i analiza mehanizama inaktivacije *MEN1* gena u tumorima endokrinog i van endokrinog sistema.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se studija sastoji iz dva dela. Prvi deo studije kojim su analizirane kliničke, patohistološke i genetske karakteristike pacijenata sa MEN1 sindromom predstavlja studiju kohorte. Podaci su dobijeni retrospektivnom analizom medicinske dokumentacije 102 uzastopna pacijenata lečena u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije u periodu od 2004 – 2017. godine. Detaljno su navedeni kriterijumi za dijagnozu MEN1 sindroma i kriterijumi na osnovu kojih su pacijenti uključeni u studiju. Prikazano je na koji način je izračunata prevalencija MEN1 sindroma u Srbiji.

Navedeno je da je svim pacijentima predhodno sprovedena genska analiza na postojanje mutacija u *MEN1* genu, a da su ti podaci takođe retrospektivno korišćeni u ovoj studiji. Dat je prikaz na koji način je pacijentima uzorkovana krv za analizu mutacija u *MEN1* genu, te da su svi pacijenti dali pismeni pristanak za sprovedenu gensku analizu. Dat je opis

korišćene metodologije za izolaciju DNK iz krvi, te da je za identifikaciju tačkastih mutacija korišćena metoda direktnog sekvenciranja DNK sa prikazom metodologije.

Drugi deo studije je eksperimentalni i obavljen je na uzorcima tumorskih tkiva pacijenata sa MEN1 sindromom dobijenih iz parafinskih kalupa nakon operacije tumora. Naveden je detaljan opis metodologije izolacije DNK iz parafinskih kalupa, kao i detaljan opis metodologije za analizu gubitka heterozigotnosti lokusa 11q13 na kojem se nalazi *MEN1* gen.

Navedeno je da je studija odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu, te da su svi ispitanici dali pismenu saglasnost za uključenje u studiju.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, 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 155 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Analizirano je ukupno 102 pacijenta sa MEN1 sindromom prema važećim kriterijumima za dijagnozu. Mutacija u *MEN1* genu nađena je kod 53,3% indeksnih slučajeva, odnosno u 65,7% kod ukupnog broja pacijenata. To praktično znači da je MEN1 fenokopija dijagnostikovana u 34,3% pacijenata. Prevalencija genetski dokazanog MEN1 sindroma u Srbiji je iznosila 0,85 obolelih na 100.000 stanovnika, bila je veća kod žena nego muškaraca a najveća u starosnoj grupi od 30 – 39 godina. Nešto više od polovine analiziranih članova porodice nije imalo ispoljenu bolest u trenutku dijagnoze; ovi pacijenti su bili značajno mlađi nego pacijenti sa klinički ispoljenim MEN1 sindromom, što znači da je genetska dijagnoza MEN1 sindroma prosečno predhodila kliničkoj za 28,4 godine.

Primarni hiperparatiroidizam nađen je kod 79,5%, tumor hipofize kod 67%, pNET kod 30,7 % pacijenata. Ne-endokrini tumori nađeni su u 19,3% pacijenata. Tumor hipofize je predstavljao najranije ispoljenu komponentu MEN1 sindroma. Atipični MEN1 dijagnostikovani su kod 19,3% pacijenata, odn. kod 22,7% indeksnih pacijenata. Drugim rečima, mutacija u *MEN1* genu je nađena kod 41,2% pacijenata sa atipičnim MEN1, gde je

najčešći tumor bio neuroendokrini tumor bronha (brNET). Vodeći uzrok smrti u celoj kohorti bili su neuroendokrini tumori pluća i pankreasa.

Analizirajući razlike između nosilaca mutacije i pacijenata bez mutacije u *MEN1* genu, tzv. MEN1 fenokopija, nađene su sledeće razlike: 1) pacijenti sa MEN1 fenokopijom imali su najviše dva klasična MEN1 tumora, za razliku od nosilaca mutacije kod kojih je zabeleženo dva ili više koegzistentnih MEN1 tumora; najčešći fenotip pacijenata sa MEN1 fenokopijom bio je PHPT/PA (primarni hiperparatiroidizam i pituitarni adenom) a nosilaca mutacije PHPT/PA/pNET (primarni hiperparatiroidizam, pituitarni adenom, pankreasni neuroendokrini tumor); 2) tumori pacijenata sa MEN1 fenokopijom bili su uvek solitarni, za razliku od nosilaca mutacije kod kojih su tumori dominantno multipli; 3) svi tumori pacijenata sa MEN1 fenokopijama javili su se značajno kasnije nego tumori kod nosilaca mutacije; 4) MEN1 fenokopije su značajno češće dijagnostikovane kod žena (86%), a pojava mutacije u *MEN1* genu dovela je do atenuacije odnosa polova (68,6% žena); 5) akromegalija je gotovo isključivo dijagnostikovana kod pacijenata sa MEN1 fenokopijom, a pNET kod nosilaca MEN1 mutacije; 6) nije bilo razlike u starosti u trenutku smrti i ukupnom preživljavanju između nosilaca mutacije i pacijenata sa MEN1 fenokopijom 7) postojanje brNET značajno je uticalo na skraćenje životnog veka MEN1 fenokopija, dok postojanje brNET nije imalo uticaja na preživljavanje nosilaca mutacije. Ovakav nalaz upućuje na zaključak da se najverovatnije radi o dve različite bolesti, gde MEN1 fenokopije predstavljaju koegzistentnu pojavu dva sporadična MEN1-asocirana tumora.

Ukupno je otkriveno 29 različitih genskih alteracija što isključuje mogućnost konsangviniteta među ispitivanim porodicama. Najveći broj ovih mutacija doveo je do skraćenja proteina menina, a najčešće su bila *frameshift* i *missense* mutacije. Identifikovano je 6 novih mutacija koje do sada nisu opisane u *Humane Gene Mutation Database, HGMD*. Sve osim jedne opisane nove mutacije dovode do skraćenja proteina što upućuje na kauzalnost. Činjenica da *missense* mutacija segregira sa patološkim fenotipom u više generacija upućuje da se radi o patogenoj mutaciji. Nije zabeleženo postojanje opšte korelacije genotipa odn. vrste i pozicije mutacije sa kliničkom slikom. Ipak, pokazano je da mutacije koje dovode do skraćenja proteina nose povećan rizik za nastanak pNET i PHPT.

Gubitak 11q13 materijala, suprotno od očekivanog, nije bio podjednako zastupljen u analiziranim tumorima: gubitak heterozigotnosti (GH) demonstriran je u 100% pNET, 77,8% paratiroidnih lezija (adenoma i hiperplazije), ni u jednom od uzoraka pituitarnih adenoma odn. bronhijalnih NET. Pokazan je gubitak heterozigotnosti u dva uzorka tumora nadbubrega

kao i u ne-neuroendokrinim tumorima - adenokarcinomu dojke i papilarnom karcinomu štitaste žlezde. Ovakav nalaz sa jedne strane govori o visoko tkivnoj specifičnosti inaktivacije *MEN1* gena koja podrazmeva postojanje drugih mehanizama inaktivacije osim gubitka heterozigotnosti koji je očekivan za tumor-supresorski gen, a sa druge ukazuje na jednu širu tumor-supresorku ulogu menina koja izlazi iz okvira endokrinog sistema.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Studija se razlikuje od svih do sada objavljenih po tome što je uključila i pacijente koji formalno ne zadovoljavaju važeće kliničke kriterijume za MEN1 sindrom - tzv. "3P" kriterijume. Pored klasičnih tumora iz 3P grupe (primarni hiperparatiroidizam, pituitarni tumor, pankreasni NET), MEN1 sindrom odlikuje izrazita fenotipska varijabilnost uzrokovana pojavom preko 20 različitih kombinacija endokrinih i ne-endokrinih tumora, zbog čega je u studiju je uključeno i 17 indeksnih pacijenata koji formalno nisu zadovoljili 3P kriterijume, ali su imali udruženu pojavu 3P tumora sa nekim drugim neuroendokrinim tumorom (atipični MEN1). U literaturi postoji samo jedna studija koja se bavi karakterizacijom pacijenata sa atipičnim MEN1 sindromom, ali i ova studija je analizirala pacijente koji su uglavnom imali 2 od 3 klasična MEN1-tumora i pridružen netipični tumor (Dackiw i sar, 1999.). Praktično ne postoji nijedna studija koja je za inkluzioni kriterijum odabrala i atipični MEN1. Ovakvim odabirom pacijenata broj indeksnih slučajeva sa mutacijom u *MEN1* genu povećan je za više od 20%, a skriningom njihovih porodica broj asimptomatskih nosilaca za 30%, što je omogućilo pravovremeno i adekvatno praćenje i lečenje ovih pacijenata.

Prevalencija MEN1 sindroma je nešto manja nego u literaturi, a razlog verovatno leži u činjenici da genetsko testiranje pacijenata nije obavezno, te da je određeni broj članova porodice odbio genetsko testiranje (Marini i sar, 2009.). Veća zastupljenost MEN1 sindroma kod žena ogovara podacima u literaturi (60:40 u korist žena) ali je sada po prvi put pokazano da je veća zastupljenost sindroma među ženama upravo na račun pacijenata kod kojih nije nađena mutacija u *MEN1* genu (Giusti i sar, 2017; Dackiw i sar, 1999; Goudet i sar, 2011.).

Do sada je objavljena samo jedna studija koja je poredila preživljavanje i penetrantnost pojedinih komponenti sindroma kod pacijenata sa MEN1 (De Laat i sar, 2016). Pomenuta studija je pokazala da sve komponente sindroma (primarni hiperparatiroidizam, pituitarni adenom i pankreasni NET) nastaju kasnije kod pacijenata bez mutacije u *MEN1* genu, te da je tok bolesti i ukupno preživljavanje bolje kod ovih pacijenata, što ide u prilog tvrnji da se možda radi o slučajnoj udruženosti sporadičnih tumora. Ova studija je prva koja

se bavi kliničkim i patohistološkim razilkama između *MEN1* pozitivnih i *MEN1* negativnih pacijenata. Kao i u gore pomenutoj studiji, niko od *MEN1* negativnih pacijenata nije imao više od dva glavna *MEN1* tumora, ali su dva pacijenta imala pridružen drugi neuroendokrini tumor, brNET. Svi tumori, uključujući i brNET i tumore nadbubrega, su se javljali u značajno starijem dobu nego kod *MEN1* pozitivnih pacijenata, a period između prvog i drugog tumora je bio značajno duži nego kod *MEN1* pozitivnih pacijenata.

Identifikacija 28 različitih mutacija i jedne velike delecije kod pacijenata koji su pripadali trideset jednoj različitoj porodici govori protiv konsangviniteta među porodicama. Kao i u drugim studijama, najveći broj mutacija predstavljale su *frameshift* i *missense* mutacije, koje su predhodno okarakterisane kao patološke ili verovatno patološke, budući da segregiraju sa *MEN1* fenotipom (Lemos i sar, 2008; Corbo i sar, 2010). Kao i u drugim studijama, mutacije su bile raspoređene duž čitavog kodirajućeg regiona *MEN1* gena, bez uočljivih "hot-spotova" (Thakker i sar, 2012). Takođe, veliki broj novootkrivenih mutacija (21,4%) u skladu je sa ranije objavljenim podacima u velikoj učestalosti novoopisanih mutacija u pacijenata sa *MEN1* sindromom (Balogh i sar, 2007; Peppia i sar, 2009.). Ova studija je pokazala da mutacije koje dovode do skraćanja proteina dovode do povećanog rizika za nastanak pankreasnih NET, ali nije primećena razlika u učestalosti ovih mutacija u odnosu na tip pNET, kao u drugim studijama (Olufemi i sar, 1998; Vierimaa i sar, 2007; Hao i sar, 2004.) Takođe je pokazano da mutacije koje dovode do skraćanja proteina dovode do češće pojave PHPT, što ranije nije pokazano. Naprotiv, pokazano je da je većina mutacija u pacijenata sa familijarnim hiperparatirodizmom upravo *missense* (Lemos i sar, 2008.).

Iako je analizirano 30 različitih tumorskih uzoraka, ova studija predstavlja jednu od većih kada je u pitanju analiza gubitka heterozigotnosti 11q13. Veća zastupljenost LOH u tumorima paraštitastih žlezdi i pNET u odnosu na pituitarne tumore u skladu je sa ranije objavljenim podacima, al i dalje ostaje nejasan način na koji tkivni milje utiče na mehanizam inaktivacije *MEN1* gena (Panett i sar, 2001.). Heterogenost među tumorima u pogledu inaktivacije *MEN1* gena prvi put je pokazana tek nedavno, 2017. godine tehnikom sekvenciranja celog egzoma (engl. *whole exome sequencing* – *WES*) kod pacijenta sa *MEN1* sindromom (Kim i sar, 2017.). Ovakva heterogenost među tumorima kod jednog istog pacijenta mogla bi upućivati na poliklonalnu tumorigenezu uprkos predispoziciji za nastanak tumora na terenu germinativne mutacije.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Tatjana Isailovic, Ivana Milicevic, Djuro Macut, Milan Petakov, Sanja Ognjanovic, Bojana Popovic, Ivana Bozic Antic, Tamara Bogavac, Valentina Elezovic Kovacevic, Dusan Ilic and Svetozar Damjanovic. **Novel Mutations in Serbian MEN1 Patients: Genotype-Phenotype Correlation.** DOI: <https://doi.org/10.1515/jomb-2018-0013>

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Kliničke i epidemiološke karakteristike sindroma multiple endokrine neoplazije tip 1 i mehanizmi inaktivacije *MEN1* gena u tumorskim tkivima endokrinog i van endokrinog sistema“ dr Tatjane Isailović, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju MEN1 sindroma. Ova studija predstavlja jednu od najvećih *single - centre* studija na MEN1 pacijentima u Evropi. Kao originalni naučni doprinos izdvaja se prikaz pacijenata sa atipičnim MEN1 sindromom, budući ne postoje literaturni podaci o ovoj grupi MEN1 pacijenata. Velika zastupljenost *MEN1* mutacija među pacijentima koji nemaju klasične MEN1 tumore kao i pojava drugih, ne-endokrinih tumora, ukazuje na potrebu za proširivanjem aktuelnih kliničkih kriterijuma za dijagnozu MEN1 sindroma.

Po prvi put je pokazano postojanje 6 novih mutacija u *MEN1* genu koje do sada nisu opisane u svetu, te da mutacije koje dovode do skraćanja proteina nose povećan rizik za nastanak pNET i PHPT.

Studija je po prvi put pokazala postojanje značajnih kliničkih i patohistoloških razlika između pacijenata sa mutacijom i bez mutacije u *MEN1* genu (MEN1 fenokopije), čime je postavljena sumnja da se radi o slučajnoj, istovremenoj pojavi sporadičnih tumora, a ne drugom naslednom sindromu kao što se do sada mislilo. Jasno definisanje kliničkih i patohistoloških razlika između dva entiteta omogućiće bolju selekciju pacijenata koji podležu genetskom skriningu kao skupoj i najčešće nedostupnoj metodi, ali i selekciju pacijenata koji ne podležu doživotnom praćenju za pojavu drugih MEN1-asociranih tumora, što je važeći stav u aktuelnom vodiču za dijagnostiku i lečenje MEN1 sindroma.

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 Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Tatjane Isailović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 25.06.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Milan Petakov

Prof. dr Ivana Novaković

Prof..dr Milica Medić Stojanoska

Mentor:

Prof. dr Svetozar Damjanović
