

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 23.10.2015. godine,(broj 5940/1), imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„ Imunohistohemijska analiza i prognosti ki zna aj markera unutrašnjeg puta
apoptoze u adenoidnom cisti nom karcinomu pljuva nih žlezda “**

kandidata mr dr Branka Doži a, zaposlenog na Stomatološkom fakultetu u Beogradu u zvanju aistenta za Nau nu obalast patologija. Mentor doktorske disertacije je Prof. dr Ivan Bori i .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Gordana Basta Jovanovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Svetislav Tati , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Miroslav Vukadinovi , profesor Stomatološkog fakulteta u Beogradu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci Branka Doži a napisana je na 86 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 5 slika, 18 tabela i 11 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** su prikazani osnovni podaci o bolestima pljuva nih žlezda, sa posebnim osvrtom na klasifikaciju i karakteristike tumora koji se u njima razvijaju. Detaljno su prezentovani podaci o adenoidnom cisti nom karcinomu (ACC), koji uklju uju incidence, starosnu i polnu distribuciju, klini ke manifestacije, makroskopski i histopatološki izgled tumora kao i puteve metastaziranja i prognosti ke faktore.

Detaljno su opisane morfološke promene i mehanizmi apoptoznog procesa. Dva osnovna puta apoptoze su spoljašnji i unutrašnji put. Dat je dosadašnji pregled literature o ulozi i zna aju faktora koji u estvuju u unutrašnjem apoptotskog puta: apoptozni proteazni faktor 1 (Apaf-1), kaspaze 9 i 3.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju imunohistohemijske ekspresije Apaf-1, kaspaze 9 i 3 u elijama adenoidnog cisti nog karcinoma pljuva nih žlezda. Ispitivana je korelacija ekspresije navedenih faktora unutrašnjeg puta u odnosu na klini ko-patološke parametre ACC (starost, pol, lokalizacija, histopatološki tip tumora i dužina preživljavanja). U cilju odre ivanja nezavisnog prognosti kog parametra pacijenata sa ACC, ra ena je me usobna korelacija imunohistohemijske ekspresije Apaf-1, kaspaze 3 i 9.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je ispitivanje obuhvatilo pedeset slu ajeva adenoidnog cisti nom karcinoma pacijenata operisanih na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta u Beogradu u period od 1998. do 2008. godine. Ovaj materijal je morfološki obra en u laboratoriji za Oralnu patologiju, Instituta Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Istraživanje je koncipirano kao studija preseka, pedeset pacijenata, muškog i ženskog pola sa ACC pljuva nih žlezda, prose ne starosti 58 godina. Za svakog pacijenta su iz uputnica za histopatološku analizu prikupljeni podaci o polu, starosti, lokalizaciji tumora. Pra eno je ukupno preživljavanje pacijenata od momenta postavljanja dijagnoze.

U ovoj studiji koristili smo tehniku tkivnog mikroniza za dobijanje parafinskih kalupa (TMA kalup). Na tkivnim presecima sa TMA kalupa (debljine 5µm) su ura ena imunohistohemijska bojenja u laboratoriji za imunohistohemiju Instituta za patologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu. Izvršeno je streptavidin-biotin imunohistohemijsko bojenje pomo u primarnih antitela, specifi nih za: Apaf-1, kaspazu 9 i kaspazu 3. Za svako primenjeno

antitelo je koriš ena pozitivna kontrola po preporuci proizvo a a. Eksperimenti su sprovo eni u skladu sa eti kim principima.

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.

Zaklju ci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada i podsti u na dalja istraživanja.

Koriš ena **literatura** sadrži spisak od 112 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U prvom delu rezultata prikazani su osnovni klini ko-patološki parametri ACC pljuva nih žlezda kod slu ajeva obuhva enih ovom studijom. Pedeset slu ajeva sa ACC, je dijagnostikovao kod 31 osobe ženskog pola i 19 muškaraca, prose ne starosti 58 godina. Ispitanici sa ACC su u odnosu na lokalizaciju grupisani u etiri grupe, i to na tumore: parotidne pljuva ne žlezde, submandibularne, malih pljuva nih žlezda tvrdog nepca i malih pljuva nih žlezda drugih lokalizacija u usnoj duplji. Naj eš a lokalizacija tumora su bile male pljuva ne žlezde tvrdog nepca (58%). U odnosu na histološki tip tumora prikazana je skoro podjednaka zastupljenost kribriformnog, tubularnog i solidnog oblika. Od pedeset pacijenata, kod kojih je dijagnostikovao ACC u pljuva nim žlezdama, na kraju ispitivanja 19 je bilo živo, dok je 31 bio sa smrtnim ishodom. U ovoj studiji je pra eno ukupno preživljavanje bolesnika sa ACC pljuva nih žlezda od momenta postavljanja dijagnoze, pri emu je prose na dužina pra enja iznosila 82 meseca.

U drugom delu rezultata, prikazani su podaci ekspresije markera unutrašnjeg puta apoptoze: Apaf-1, kaspaze 9 i 3 u elijama ACC.

Apaf-1 se eksprimovao u citoplazmi tumorskih elija, pri emu je naj eš e pokazivao jak intenzitet ekspresije (3+). Razlike u intenzitetu ekspresije Apaf-1 u tumorskim elijama ACC pljuva nih žlezda nisu imale statisti ki zna aj. Sli an rezultat je dobijen i u odnosu na analizirane klini ko-patološke parametre.

Kaspaza 9 je pokazivala i citoplazmatsku i jedarnu pozitivnost u elijama ACC pri emu su razli iti nivoi ekspresije imali statisti ku zna ajnost. Postojala je statisti ka zna ajnost u ekspresiji kaspaze 9 i u odnosu na pol pacijenata sa ACC. Umerena pozitivnost je naj eš e ocenjena kod osoba muškog pola, a jaka kod osoba ženskog pola. U odnosu na ostale klini ko patološke parameter, intenzitet ekspresije kasapze 9 nije pokazivao statisti ku zna ajnost.

Kaspaza 3 se eksprimovala samo u citoplazmi tumorskih elija. Naj eš e je bio zastupljen, jak intenzitet ekspresije ovog markera. U odnosu na klini ko patološke parametre pacijenata sa ACC pljuva nih žlezda razli iti intenziteti ekspresije kaspaze 3 nisu pokazivali statisti ku zna ajnost.

U odnosu na preživljavanje pacijenata sa ACC, ispitivani markeri unutrašnjeg puta apoptoze, Apaf-1, kaspaze 9 i 3, nisu pokazivali statisti ku zna ajnost

U završnom delu rada prikazani su rezultati me usobne korelacije imunohistohemijske ekspresije sva tri ispitivana markera, i dokazan je statisti ki zna aj izme u razli itih nivoa ekspresije Apaf-1 i ekspresije kaspaze 3.

Univarijantnim Cox-ovim regresionim modelom, za razliku od ostalih klini ko patoloških parametara, samo se starost izdvojila kao prediktor preživljavanja posmatrane grupe obolelih sa ACC pljuva nih žlezda.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Kako u literaturi tako i u ovoj studiji ACC je prikazan kao tumor koji je naj eš e lokalizovan u malim pljuva nim žlezdama. U odnosu na pol, literarni podaci ukazuju da se radi o tumoru koji se skoro podjednako razvija kod oba pola. Publikovani su i radovi sa nešto ve om prevalencom ovog tumora kod muškaraca, ali i radovi koji ga prikazuju kao tumor koji se eš e javlja kod osoba ženskog pola. U ovoj studiji je nešto ve a u estalost ACC bila kod osoba ženskog pola.

Na osnovu histološkog izgleda ACC se klasifikuje na kribriformni, tubularni i solidni tip. Kao klasi ni izgled ACC opisuje se kombinacija kribriformne i tubularne slike. Solidna slika ACC se esto vezuje za lošiji gradus i lošiju prognozu ovog tumora. Rezultati konsektivnih

slučajeva salivarnih ACC u ovom istraživanju, su se prema učestalosti u odnosu na histološke strukture, razlikovali od podataka iz literature. Najčešće su bili zastupljeni tumori sa tubularnom i solidnom slikom.

ACC je malignitet koji mnogi autori smatraju klinički visokogradusnom neoplazmom. Opisuje se kao tumor nepredvidivog i progresivnog kliničkog toka, za koji se smatra da ima dugoročno lošu prognozu. Rezultati preživljavanja pacijenata sa ACC, u dostupnoj literaturi, ukazuju da procenat preživelih pacijenata opada na petogodišnjem i desetogodišnjem nivou. Slični rezultati preživljavanja su prikazani i u ovoj studiji.

Do sada nije ispitivana imunohistohemijska ekspresija Apaf-1, kaspaze 9 i 3 u ACC pljuvačnih žlezda.

Apaf-1, kao sastavni deo apoptosoma, u unutrašnjem putu apoptoze igra značajnu ulogu. U slučaju ACC se ekspresiovala u citoplazmi, pri čemu je najčešće bio zastupljen jak intenzitet ekspresije. Sličnu imunopozitivnost za ovo antitelo su pokazivale i ćelije malignog melanoma i karcinoma cerviksa. U suprotnosti sa rezultatima ekspresije Apaf-1 u ovoj studiji, drugi autori su prikazali njegovu smanjenu imunopozitivnost u ćelijama adenokarcinoma debelog creva.

Korelacija imunohistohemijske ekspresije Apaf-1 i kliničko patoloških parametara u literaturi prikazuju različitu značajku. U melanoma, povećana ekspresija Apaf-1 nije imala statistički značaj u odnosu na pol, starost, histološki tip i lokalizaciju tumora, za razliku od slučajeva sa karcinomom cerviksa gde se pokazala statistički značajna u odnosu na nodalni status. Smanjena ekspresija Apaf-1, je značajno korelirala sa histološkim tipom i prisustvom regionalnih i udaljenih metastaza kod pacijenata sa karcinomom debelog creva. U ispitivanim slučajevima ACC, ekspresija Apaf-1 nije imala statistički značaj u odnosu na kliničko patološke parametre i preživljavanje pacijenata.

U procesu apoptoze bez obzira na vrstu stimulanasa, ključni događaj predstavlja kaskadna reakcija proteolitičke aktivacije enzima kaspaza, te stoga neki autori smatraju da gubitak kaspazne ekspresije doprinosi sposobnosti maligne ćelije da izbegne apoptozu. U skladu sa ovim, smanjena kaspazna ekspresija je povezana sa lošom prognozom i/ili otporom na hemioterapiju kod različitih vrsta tumora, kao što su karcinom jednjaka, nesitno ćelijski karcinom pluća, meduloblastomi dečjeg uzrasta i drugi. U ovoj studiji kaspaza 9, koja je pokazivala i jedarnu i citoplazmatsku pozitivnost, statistički značajano se visoko ekspresiovala u ćelijama ACC. Ovakav nalaz ide u prilog indolentnom rastu ovog tumora.

Da bi se utvrdila mogućnost korišćenja kaspaze 9 kao prognostičkog markera, analizirana je i njena ekspresija u odnosu na kliničko-patološke parametre. Ekspresija kaspaze 9 u elijama ACC je imala statističku značajnost samo u odnosu na pol pacijenata. U literaturi su dosta oskudni podaci o povezanosti ekspresije kaspaze 9 u odnosu na kliničko-patološke parametre malignih tumora. Jedna studija je dokazala da je povišen nivo ekspresije kaspaze 9 pokazivao značajnu povezanost sa metastatskim potencijalom nesitno elijskog karcinoma pljuvačnice, dok je kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom, Kaplan–Mejerovom analizom pokazano da su pacijenti sa visokom ekspresijom kaspaze 9 imali kraće preživljavanje.

Apoptozni proces zavisi i od aktivnosti egzekutornih kaspaza kao što su kaspaze 3 i 7. U ovoj studiji je prikazano da se kaspaza 3 u elijama ACC pljuvačnih žlezda ekspresovala samo u citoplazmi tumorskih elija, mada se u literaturi prikazuje i njena jedarna ekspresija. U elijama ACC kaspaza 3 je najčešće bila ocenjena kao jaka i umerena ekspresija. U odnosu na kliničko-patološke parametre, kao i u odnosu na preživljavanje, ekspresija kaspaze 3 se nije pokazala kao statistički značajna kod pacijenata sa ACC pljuvačnih žlezda. Slično rezultatima ovog istraživanja nije bilo ekspresije kaspaze 3 nije u korelaciji u odnosu na pol i lokalizaciju malignih i atipičnih meningeoma, kao i kod slučajeva difuznog krupno elijskog B limfoma. Kod karcinoma kolona kaspaza 3 je značajno korelirala sa pojavom recidiva i metastaziranjem.

U ovoj disertaciji je analizirana i korelacija između intenziteta ekspresije Apaf-1, kaspaze 9 i 3 u ACC pljuvačnih žlezda, i pokazano je da su značajno korelirale ekspresije Apaf-1 i kaspaze 3. Autor zaključuje da ovi markeri imaju značajnu ulogu u patogenetskim mehanizmima ACC, i da zajedno sa kaspazom 9, predstavljaju predmet budućih istraživanja, u cilju boljeg razumevanja razvoja ovog tumora i postizanja što boljeg terapijskog odgovora.

Univarijantnom Cox-ovom regresionom analizom, pokazano je da samo starost pacijenata može biti prediktor slabijeg preživljavanja obolelih od ACC pljuvačnih žlezda, od svih posmatranih kliničko-patoloških parametara.

D) Objavljen rad koji čini deo doktorske disertacije

Doži B, Glumac S, Borić N, Doži M, Anić B, Borić I. Immunohistochemical expression of caspases 9 and 3 in adenoid cystic carcinoma salivary gland and association with clinicopathological parameters. J BUON 2016; 21(1). (Article in press).

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija pod nazivom „**Imunohistohemijska analiza i prognostički značaj markera unutrašnjeg puta apoptoze u adenoidnom cističnom karcinomu pljuvačnih žlezda**“ dr **Branka Dožića**, predstavlja originalni naučni doprinos o razumevanju molekularnih mehanizama unutrašnjeg puta apoptoze. U ovom istraživanju dokazan je različit intenzitet ekspresije Apaf-1, kaspaze 9 i 3, kao i njihov odnos sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa adenoidnim cističnim karcinomom. Rezultati ove doktorske disertacije otvaraju nove pravce istraživanja funkcionalnog značaja ovih molekula u adenoidnom cističnom karcinomu u cilju boljeg razumevanja razvoja tumora i postizanja što boljeg terapijskog odgovora.

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 vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Branka Dožića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 05.11.2015.godine

Članovi Komisije:

Mentor: Prof. dr Ivan Borić

1. Prof. dr Gordana Basta Jovanović

2. Prof. dr Svetislav Tatić

3. Prof. dr Miroslav Vukadinović
