

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 13.06.2016. godine, broj 5940/5, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Korelacija ekspresije MYC i MYCN proteina i autofagije u neuroblastnim tumorima de jeg doba“

kandidata dr Gordane Samardžija, zaposlene u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „dr Vukan upi “ u Beogradu.

Mentor je Prof. dr Dragana Vuji , a komentor VNS dr Slaviša uri i .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Doc. dr Tamara Kravi -Stevovi , docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Tatjana Terzi , docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. N. Sav.dr Mileva Mi i , Institut za medicinska istraživanja 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 dr Gordane Samardžija napisana je na ukupno 131 strani i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 27 tabela,20 grafikona i 43 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skra enica koriš enih u tekstu.

U **uvodu** je definisano šta su to neuroblastni tumori, koji tipovi neuroblastnih tumora postoje, njihove epidemiološke karakteristike, klini ka slika, patohistološke i geneti ke osobine. Navedeni su detaljni kriterijumi patohistološke klasifikacije i opisani aktuelni prognosti ki

parametri za procenu neuroblastnih tumora. Na adekvatan na in je opisana pojava i tipovi autofagije sa mehanizmima regulacije, kao i prisustvo autofagije u malignim tumorima sa njenim u eš em u procesu tumorogeneze.

Prikazan je zna aj *MYCN* gena i njegove amplifikacije kao najzna ajnijeg prognosti kog faktora za neuroblastom i izneta su saznanja o odnosu porodice *MYC* gena sa procesom autofagije.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja prisustva autofagije u razli itim tipovima neuroblastnih tumora elektronskomikroskopskom analizom i primenom imunohistohemijskog bojenja LC3B antitelom sa analizom mogu eg prognosti kog zna aja ove pojave kod neuroblastoma. Tako e, kao cilj rada je definisano i ispitivanje postojanja ekspresije *MYC* i *MYCN* proteina u neuroblastnim tumorima primenom imunohistohemijskog bojenja i procena njihovog potencijalnog prognosti kog zna aja, kao i njihovog odnosa sa do sada poznatim prognosti kim parametrima.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je sprovedena u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „dr Vukan upi “ i Institutu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Detaljno je opisana procedura patohistološke analize u parafinu ukalupljenih, formalinom fiksiranih, uzoraka tumorskog tkiva koji se uvaju u arhivi Odeljenja za klini ku patologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „dr Vukan upi “. Opisana je procedura formiranja tkivnog mikroniza i imunohistohemijskog bojenja, kao i procedura fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) kojom su ispitivani geneti ki parametri *MYCN* amplifikacija i 1p delecija. Zatim, opisana je procedura pripreme na -80°C smrznutih svežih uzoraka tumorskog tkiva za elektronskomikroskopsku analizu i sama analiza. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je od strane Eti kog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

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. Koriš ena **literatura** sadrži spisak od 384 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Neuroblastni tumori (NT) su analizirani u grupi koju su činili ganglioneurom (GN) i intermiksni ganglioneuroblastom (iGNB) po deset bolesnika i grupa bolesnika sa neuroblastomom (NB), njih četrdeset od čega dvadeset sa *MYCN* amplifikacijom. Muški pol je bio češći (1.5:1), a medijana uzrasta je iznosila 36 meseci za ceo uzorak, a 22 meseca za grupu bolesnika sa NB. Potvrđeno je da su bolesnici sa GN i iGNB značajno stariji od bolesnika sa NB, a u grupi GN i iGNB je bilo više devojaka, dok je u grupi NB bilo više dečaka. Najčešće je bila zastupljena abdominalna lokalizacija. Nepovoljan klinički stadijum (IV) imalo je 45% bolesnika, a povoljan (IVs, I, II, III) 55%. Analizom uticaja uzrasta na preživljavanje bolesnika sa NB dobijena je statistički značajna razlika u preživljavanju između grupa mlađih i starijih od 18 meseci. Statistički prognostički značaj kliničkih stadijuma bolesti nije bilo.

Patohistološkom analizom prema kriterijumima Internacionalne patološke klasifikacije za neuroblastom (INPC) urađena je podtipizacija NB i svrstavanje u histološke prognostičke grupe, povoljne (FH) i nepovoljne (UH) prognoze. Nađena je statistički značajna razlika u prognozi između nediferentovanog (UD) i slabodiferentovanog (PD) podtipa neuroblastoma, kao i između prognozičkih grupa (FH:UH). Proveravan je i prognostički značaj mitotsko-karioretskog indeksa, kao parametra koji učestvuje u procesu određivanja histoloških prognostičkih grupa i nije nađena statistički značajna razlika između grupa niskog, srednjeg i visokog MKI.

U ispitivanoj grupi analizirani su i genetički prognostički parametri, *MYCN* amplifikacija i 1p delecija, i dobijena je statistički značajna razlika u prognozi između grupa sa i bez ovih alteracija. U maloj grupi bolesnika analizirano je i registrovano 17q umnožavanje.

Na delu uzorka, za koji su bili dostupni uzorci svežeg, na -80°C smrznutih uzoraka (ukupno 20) urađena je elektronskomikroskopska analiza. Opisane su ultrastrukturne karakteristike NT i potom brojano (u 60 polja po uzorku) prisustvo autofagnih vakuola (AV), kao i brojnih drugih organela, njihov broj je izražavan kao prosečan broj po polju uzorka i upoređivan između grupe NT sa dobrom prognozom (GN, iGNB) i NB kao tumora sa pretežno lošom prognozom. Nađeno je statistički značajno više AV u NB i pokazana značajna veza autofagije sa stepenom maligniteta NT. Dobijen je i značajno veći broj oštećenih mitohondrija po polju NB u odnosu na GN i iGNB, a u većem procentu analiziranih polja NB nađeni su i dilatirani

endoplazmatski retikulum (ER). Kada je broj AV uporeivan sa prisustvom *MYCN* amplifikacije nije nađena statistički značajna razlika.

U daljoj analizi autofagije u NT primenjena je imunohistohemijska analiza, u parafinu ukalupljenih uzoraka, LC3B antitelom. Rezultati ovog bojenja su bili u skladu sa elektronskomikroskopskim nalazima, ekspresija LC3B antitela je bila viša u uzorcima NB u odnosu na GN i iGNB. Daljom analizom moguće je prognostički značaj ove ekspresije, kao posrednog pokazatelja broja prisutnih autolizozoma, a time i autofagije nije dobijena statistički značajna razlika u preživljavanju za grupe sa niskim i visokim stepenom LC3B ekspresije. Ipak, nešto niža stopa preživljavanja nađena je u grupi sa visokim stepenom LC3B ekspresije.

U nastavku urađena je i imunohistohemijska analiza prisustva *MYCN* i *MYC* proteina u ćelijama NT. *MYCN* protein je uođen u jedrima svih tipova NT, ali je njegovo prisustvo u NB bilo ređe. Napravljen je skor ekspresije ovog proteina u NB, na osnovu procenta zahvaćenih ćelija i intenziteta obojenosti i analizirani tumori su svrstani u tri grupe: visokog, srednjeg i niskog nivoa ekspresije. Analizom preživljavanja dobijena je statistički značajna razlika između grupa sa visokom i niskom ekspresijom *MYCN* proteina. Imunohistohemijskim bojenjem *MYC* proteinom nije uođena pozitivnost ni u jednom tumoru kako u prognostički dobroj grupi GN i iGNB, tako i u grupi NB. Nađena je samo kod šest uzoraka NB slaba, fokalna pozitivnost endotelnih ćelija krvnih sudova.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Do sada nije urađeno ni jedno istraživanje ovog tipa u našoj sredini, a u stranoj literaturi autofagija nije analizirana na hirurški dobijenim uzorcima neuroblastnih tumora pedijatrijskih bolesnika, već su studije rađene na neuroblastomskim ćelijama.

Relevantna zahvaćenost dečaka neuroblastnim tumorima bila je u skladu sa podacima iz literature (Zimling i sar., 2008). Medijana uzrasta je bila približna medijani danske studije (Zimling i sar., 2008), a ispitivana grupa bolesnika sa GN i iGNB su bili stariji u odnosu na bolesnike u multicentričnoj studiji (Shimada i sar., 2003). Medijana uzrasta bolesnika sa NB bila je nešto veća od literarnih podataka (Monclair, 2006, Shimada i sar., 2003). Izvedena studija je potvrdila činjenicu da su bolesnici sa GN i iGNB stariji od bolesnika sa NB (Peuchmaur i sar., 2003). U istraživanju je nađena prognostički značaj INPC klasifikacije, što je u skladu sa podacima iz literature (Shimada i sar., 2003, Joshi i sr., 1993, Umehara i sar., 2000, De

Bernardi i sar., 2009). Prognosti ki zna aj uzrasta je u korelaciji sa podacima iz literature (Cohn i sar., 2009). Pojava *MYCN* amplifikacije bila je eš a u grupi sa nepovoljnom histološkom prognozom, što je u skladu sa nalazima iz literature (Goto i sar., 2001, Bagatell i sar., 2009, Ambros i sar., 2009), kao i dobijena visoko statisti ki zna ajna razlika u preživljavanju izme u grupa sa i bez amplifikacije (Bagatell i sar., 2009). U ispitivanom uzorku je prisustvo 1p delecije imalo zna aj za preživljavanje, sa statisti ki zna ajnom razlikom izme u grupa sa i bez delecije što je na eno u nekim istraživanjima (Altungoz i sar., 2007) dok je u drugim na en samo uticaj na preživljavanje bez pojave relapsa (EFS), a ne i veza sa ukupnim preživljavanjem (Maris i sar., 2001).

Brojne studije su ukazale na uticaj autofagije na tumorogenezu (Kungi sar., 2011, Das i sar., 2012), s jedne strane funkcionišu i kao tumor supresorski mehanizam (Maiuri i sar., 2009), a sa druge strane kada je tumor formiran autofagija omogu ava tumorskim elijama da prežive u nepovoljnim uslovima sredine (Degenhardt i sar., 2006). Kandidatkinja je sprovedenim ispitivanjem, primenom elektronske mikroskopije i imunohistohemijskim bojenjem LC3B antitelom, pokazala prisustvo autofagije u svim tipovima NT, od benignih (GN) do najmalignijih NB, što bi moglo da ukazuje, kao što su neki autori špekulisali u analizi kolorektalnih tumora (Sato i sar., 2007), da je autofagija uklju ena u rane faze tumorogeneze. Statisti ki zna ajno ve i broj AV prisutan u NB u odnosu na GN i iGNB, ukazuje na vezu autofagije sa tumorima višeg stepena maligniteta i lošijim ishodom, što je u skladu sa nalazom da autofagija omogu ava preživljavanje elija u uslovima stresa, recikliranje aminokiselina, sintezu novih protein i produkciju energije (Degenhardt i sar., 2006). Istovremeno treba imati u vidu da pove ani broj AV ne ukazuje obavezno na pove anu autofagnu aktivnost (Ravikumar i sar., 2010, Klionsky i sar., 2016). Ultrastrukturnom analizom na en je i pove an broj ošte enih mitohondrija u elijama NB sa prisustvom mitofagije koja predstavlja glavni proces kojim se održava zdrava populacija mitohondrija, bitna za održavanje elije u životu (Youle i sar., 2011). Uz to na en je i statisti ki zna ajno ve i procenat elija sa dilatiranim ER u NB, što može ukazivati na postojanje ER stresa, koji ima ulogu u aktivaciji autofagije (Yorimitsu i sar., 2006, Basile i sar., 2013). Neki objavljeni rezultati ukazuju na vezu elijske autofagije sa nivoom *MYCN* ekspresije (Wang i sar., 2011, Wang i sar., 2014), što u sprovedenom istraživanju nije potvr eno. Postoji mogu nost da ošte enje mitohondrija i oksidativni stres sa dilatacijom ER i mogu im ER stresom predstavljaju faktore koji se pojavljuju ranije u procesu indukcije autofagije ili su zna ajniji za taj proces u odnosu na *MYCN* amplifikaciju. Dobijeni rezultati ekspresije LC3B bili su u skladu sa studijama

sprovedenim na različitim tumorima (Yoshioka i sar., 2008, Schlafl i sar., 2015). Nije nađena statistički značajna razlika u preživljavanju između grupa sa visokom i niskom LC3B ekspresijom kod NB, što nije nađeno ni u istraživanjima na nekim drugim tumorima (Biggers i sar., 2013, Del Bello i sar., 2013). Nedavno sprovedenim istraživanjima pokazano je moguće i prognostički značaj ekspresije MYC i MYCN proteina u ćelijama neuroblastoma (Wang i sar., 2015). Sprovedenim istraživanjima, kandidatkinja je našla statistički značajnu razliku u preživljavanju između grupa sa visokim i niskim gradusom MYCN protein ekspresije, što ukazuje da bi ekspresija MYCN proteina mogao biti novi prognostički parameter. Nasuprot tome, u studiji nije nađena ekspresija MYC proteina ni u jednoj grupi NT, ali je uočena pojava ovog proteina u endotelnim ćelijama krvnih sudova čime je potkrepljen u literaturi postojeci podatak o značaju MYC-a za proces angiogeneze (Baudino i sar., 2002).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Gordana Samardžija, Tamara Kravic-Stevovic, Slavisa Djuricic, Dragomir Djokic, Marina Djurisic, Darko Ciric, Tamara Martinovic, Vladimir Bumbasirevic, Dragana Vujic. Aggressive human neuroblastomas show a massive increase in the numbers of autophagic vacuoles and damaged mitochondria. Ultrastructural Pathology. (Manuscript ID UUSP-2012-0016, prihvaćen za objavljivanje 05.05.2016.)

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Korelacija ekspresije MYC i MYCN proteina i autofagije u neuroblastnim tumorima dečjeg doba“ dr Gordane Samardžija, kao prvi ovakav rad kod nas predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju prirode neuroblastnih tumora, njihovih patohistoloških, kliničkih i genetičkih osobina, kao i ultrastrukturnih karakteristika. Ovo je, koliko je nama poznato, i prvi rad u svetskoj literaturi koji proučava proces autofagije na hirurškim uzorcima neuroblastnih tumora pedijatrijskih pacijenata, a ne na genetički formiranim ćelijskim linijama. Proces autofagije kod neuroblastoma je, po prvi put, upoređivan sa do sada poznatim prognostičkim parametrima. Takođe i proučavanje ekspresije MYC i MYCN proteina u ćelijama neuroblastnih tumora je prvi put urađeno kod nas, a postoji samo nekoliko publikacija objavljenih u svetskoj literaturi sa ovom temom.

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, imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Nominativno u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Gordane Samardžija i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 05.07.2016.

Članovi Komisije:

Doc. dr Tamara Kravić-Stevović

Doc. dr Tatjana Terzić

Prof. dr Mileva Milić

Mentor:

Prof. dr Dragana Vujić

Komentor:

VNS dr Slaviša Stanić
