

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana **18.04.2019.** godine, broj **9700/3**, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Ispitivanje ekspresije proteina ćelijskog ciklusa kod bolesnika sa karcinomom bubrežnih ćelija“**

kandidatkinje dr Dragane Latić, zaposlene u Centru za patologiju Kliničkog centra Crne Gore.

Mentor je prof. dr Sanja Radojević-Škodrić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ivana Novaković, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Miodrag Radunović, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Podgorici
3. Prof. dr Nada Tomanović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

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 Dragane Latić napisana je na ukupno 126 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključak i literatura. U disertaciji se nalaze ukupno 34 tabele, 41 grafikon i 11 slika. Doktorska

disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **Uvodu** je definisano šta je karcinom bubrežnih ćelija (RCC), istorijski aspekti, poznati etiološki i epidemiološki podaci. Navedena je detaljna klasifikacija karcinoma bubrežnih ćelija prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), precizno je objašnjen način gradiranja, određivanja TNM stadijuma bolesti, opisani su svi histološki tipovi karcinoma bubrežnih ćelija. Na adekvatan način su opisane dijagnostičke procedure, osnovi lečenja kao i očekivani postoperativni ishod, tj. prognoza različitih tipova RCC, kao i njihovi genetski profili.

Takođe, prikazan je detaljan osvrt na dosadašnja saznanja o ćelijskom ciklusu, načinima regulacije ćelijskog ciklusa i pojašnjene uloge proteina koji su predmet istraživanja- ciklina A, ciklina D1, p16 i p57.

**Ciljevi rada** su precizno definisani- ispitati ekspresiju proteina koji regulišu ćelijski ciklus kod pacijenata sa karcinomom bubrežnih ćelija- ciklina A, ciklina B, ciklina D1, p16 i p57 imunohistohemijskom metodom, ekspresiju gena koji ih kodiraju- CCNA, CCNB, CCND, CDKN2A i CDKN1C qRT-PCR metodom i korelirati dobijene rezultate u odnosu na kliničko-morfološke parametre- pol, starost, veličinu tumora, histološki tip, nuklearni gradus, TNM stadijum bolesti, dužinu preživljavanja i smrtni ishod (ukoliko je nastupio) i ispitati da li postoji korelacija između imunohistohemijske ekspresije ciklina A, ciklina B, ciklina D1, p16 i p57 i rezultata amplifikacije gena CCNA, CCNB, CCND, CDKN2A, CDKN1C.

U poglavlju **Materijal i metode** je navedeno da se radi o retrospektivnoj studiji koja je sprovedena na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, analizom operativnog materijala 74 pacijenta sa RCC Klinike za urologiju Kliničkog centra Srbije i odeljenja urologije Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović“ u Beogradu. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključenja u studiju. Nakon obrade dostavljenog materijala u laboratoriji Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, izvršena je patohistološka analiza i kod svih je verifikovan karcinom bubrežnih ćelija. Za sve pacijente prikupljeni su podaci iz medicinske dokumentacije: pol, starost bolesnika, dužina preživljavanja zaključno sa septembrom 2015. i eventualno, ukoliko je nastupio smrtni ishod. Bolesnici su prema klasifikaciji i kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) tumora urinarnog sistema i muških genitalnih organa

iz 2016. godine svrstani u grupe sa svetloćelijskim, papilarnim i hromofobnim histološkim tipom. Prema ovoj klasifikaciji bolesnici su svrstani u kategorije nižeg i višeg nuklearnog gradusa, kao i nižeg i višeg TNM stadijuma. Načinjena je imunohistohemijska obrada uzoraka kao i qRT-PCR analiza ispitivanih gena iz odabranih parafinskih kalupa poštujući precizno utvrđene procedure, a potom izvršena statistička analiza dobijenih podataka.

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.

**Zaključak** sažeto prikazuje najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **Literatura** sadrži spisak od 98 referenci.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Imunohistohemijski metod je pokazao visok nivo ekspresije ciklina A kod starijih pacijenata ženskog pola, sa većim dijametrom tumora, višim gradusom i višim TNM stadijumom, bez statističke značajnosti, i značajnu ekspresiju u papilarnom histološkom tipu i kod pacijenata sa smrtnim ishodom. Ekspresija CCNA je jednako pokazivala normalan nivo ili duplikaciju u grupi visokog gradusa. Ekspresija ciklina D1 opada sa povećanjem starosne kategorije i dimenzija tumora, slična je kod višeg i nižeg stadijuma, razlika prema gradusu je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti. Najveći procenat pacijenata kod kojih je ekspresija ciklina D1 > 10% su oni sa svetloćelijskim tipom, što je bilo statistički značajno. Ekspresija CCND pokazuje značajnost koja je blizu konvencionalne kod papilarnog histološkog tipa - trećina bolesnika imala je deleciju gena. Ekspresija p16 > 10% je pronađena kod svih pacijenata sa papilarnim RCC ( $p < 0.001$ ). Ekspresija p16 pokazuje trend rasta sa povećanjem starosne kategorije i dimenzija tumora. Broj umrlih je veći u grupi pacijenata sa p16 > 10% i to je zanimljiv rezultat, jer je p16 tumor supresor. Razlika u ekspresiji CDKN2A je na konvencionalnom nivou značajnosti (isključeni pacijenti sa duplikacijom), postoji statistički značajna razlika između tri grupe ekspresije CDKN2A gena (delecija i normalan nalaz) u korelaciji sa histološkim tipom. Smrtni ishod je manje čest kod pacijenata sa delecijom, bez statističke značajnosti. Pacijenti sa normalnom ekspresijom CDKN1C uglavnom imaju

p57>5% (jedan slučaj sa duplikacijom i p57<5%). Medijana p57 je dvostruko veća kod muškog pola i taj je rezultat blizu konvencionalnog nivoa značajnosti. Medijana p57 veća je kod starijih bolesnika, tumora većih dimenzija i ukoliko je nastupio smrtni ishod, ali bez statističke značajnosti. Ekspresija p57>5% je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti kod tumora dijametra>7cm, svetloćelijskog histološkog tipa i bolesnika kod kojih je nastupio smrtni ishod. Grupa sa normalnim nivoom ekspresije CDKN1C imala je lošiji klinički ishod. Urađena je Koksova univarijabilna regresiona analiza kliničkih karakteristika i rezultati su jasni– prediktori preživljavanja su starost, dimenzije tumora i stadijum bolesti. Koksova univarijabilna regresiona analiza ekspresije ispitivanih gena i proteina pokazala je da ciklin A može biti prediktor smrtnog ishoda kod bolesnika sa karcinomom bubrežnih ćelija. Backward metoda multivarijabilne regresije pokazuje da su značajni prediktori preživljavanja starost, gradus, stadijum bolesti i ekspresija ciklina A.

### **C) Uparedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Do danas, sprovedeno je više istraživanja u svetu u kojima je analizirana ekspresija ispitivanih proteina, međutim, u literaturi nije zabeleženo da je jedna studija istovremeno obuhvatala sve ispitivane proteine iz ove disertacije. Objavljeni su rezultati velikog broja studija koje su za predmet istraživanja imale analizu ekspresije proteina koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa u različitim humanim tumorima. Poznato je da su istraživanja sprovedena kod pacijenata sa RCC, ali i kod brojnih drugih malignih, pa i degenerativnih oboljenja.

Među ispitanicima je zabeležena veća medijana ekspresije ciklina A kod žena, pacijenata starije životne dobi, sa većim dimenzijama tumora, višim gradusom i stadijumom bolesti, kao i u odnosu na histološki tip karcinoma bubrežnih ćelija- kod papilarnog RCC ekspresija ciklina A je viša nego kod ostalih. Kako je istaknuto, ciklin A je snažan prediktor lošeg kliničkog ishoda. Studija čiji su rezultati saglasni sa ovim sprovedena je u Finskoj, na uzorku od 118 bolesnika sa RCC, i pokazuje da je povišena ekspresija ciklina A udružena sa proliferacijom RCC, predstavlja prognostički faktor u svim stadijumima RCC i prediktor je preživljavanja bez ponovnog javljanja bolesti (Aaltoma i sar., 1999). U istraživanju koje su sprovedeli Santala i saradnici istaknut je povišen nivo ekspresije ciklina A kod žena sa dijagnostikovanim adenokarcinomom endometrijuma (endometrioidni tip), koji je

nedvosmisleno ukazivao na udruženost sa lošijom prognozom, višim FIGO stadijumom i gradusom tumora (Santala i sar., 2014). Rezultati studije autora koji analiziraju ekspresiju ciklina A zajedno sa Ki67 govore u prilog razvoja metastaza i posledičnog višeg stadijuma bolesti kod ispitanika sa neuroendokrinim tumorom rektuma (Jernman i sar., 2014). Pacijenti su imali metastatske depozite u vezi sa povišenom ekspresijom pomenutih ispitivanih imunohistohemijskih markera. Metwally i saradnici su pokazali povećanu ekspresiju ciklina A i ciklina E i ulogu u nastanku karcinoma endometrijuma kod žena obolelih od karcinoma dojke, na terapiji tamoksifenom (Metwally i sar., 2013). Istraživanje koje je obuhvatalo obolele od karcinoma dojke ističe značaj određivanja proliferativnog statusa kvantifikacijom imunohistohemijske ekspresije Ki67 i ciklina A (Mu i sar., 2015). Istraživanje koje je sproveo Chen i saradnici analizira ekspresiju ciklina A kod skvamoznog karcinoma usne duplje, gde je utvrđena progresija bolesti u vezi sa povišenom ekspresijom (Chen i sar., 2003). Studija koja je obuhvatila 60 pacijenata sa kolorektalnim karcinomom kod kojih je analizirana ekspresija ciklina A, ciklina D i Ki67, pokazala je da je povišena ekspresija ciklina A u vezi sa lošom diferencijacijom i većim dimenzijama tumora (Bahnassy i sar., 2004). Posredna uloga ciklina A u tumorigenezi pokazana je kod pacijenata sa nesitnoćelijskim tumorom pluća (Wang i sar., 2015). Prekomerna ekspresija ciklina A u pomenutim istraživanjima u korelaciji je sa nepovoljnim prognostičkim faktorima, što je u saglasnosti sa rezultatima doktorske disertacije. Rezultat analize ekspresije CCNA govori da u odnosu na nuklearni gradus postoji statistička značajnost kad posmatramo grupu bolesnika sa nižim gradusom, gde je pretežno normalna ekspresija, u odnosu na one sa višim gradusom, gde je normalna ekspresija i duplikacija. Ispitivana je uloga 19 gena i različitih regulatornih mehanizama u ccRCC-u, (među kojima je i CCNA) i rezultati ukazuju na značaj ekspresije CCNA kod različitih stadijuma svetloćelijskog histološkog tipa, kao i da je ključna tačka u nastanku ccRCC disregulacija ćelijskog ciklusa (Wang i sar., 2014). Iako nije statistički značajan, jedan od rezultata studije je kraće vreme preživljavanja i češći smrtni ishod kod detektovane duplikacije CCNA, što ipak treba tumačiti oprezno, s obzirom na to da je istraživanje obuhvatalo relativno mali broj bolesnika. Tumačenjem rezultata statističkih metoda, pokazano je da su nivoi ekspresije ciklina D1 nedovoljno ubedljivi u odnosu na stadijum, nuklearni gradus, pol, sa diskretnom tendencijom opadanja kod starijih pacijenata i većim dimenzijama tumora. Rezultati studije koja je već pomenuta u delu analize ekspresije ciklina A, pokazuju povišenu ekspresiju ciklina D1 kod pacijenata starijih od 65 godina, nižeg gradusa i sa udruženom ekspresijom p53 (Aaltoma i sar., 1999). Nasuprot tome, jedan od značajnijih rezultata studije je signifikantna ekspresija ciklina D1 kod svetloćelijskog histološkog tipa.

Pokazana je povišena ekspresija u svetloćelijskom RCC u odnosu na hromofobni i papilarni tip, i takođe visok nivo ekspresije u vezi sa dobrom prognozom (Lima i sar., 2014). Autori studije u kojoj je imunohistohemijskom i Western blot metodom analizirana ekspresija proteina G1/S faze ćelijskog ciklusa (među kojima je i ciklin D1) saglasni su sa ovim rezultatom, i ističu da je niži nivo ekspresije ciklina D1 kod konvencionalnog RCC udružen sa lošijom prognozom (Aaltoma i sar., 1999). Povišenu ekspresiju u korelaciji sa dobrom prognozom pronašli su Leroy i saradnici kod svetloćelijskog papilarnog RCC (Leroy i sar., 2014). Analizirana je između ostalih i imunohistohemijska ekspresija p16, p57 i ciklina D, te su autori ustanovili vezu sa lošijim ishodom kod svetloćelijskog RCC, i istakli da je prognostički skor lošiji ukoliko postoji disregulacija 4 i više markera (Gayed i sar., 2013). Još jedna studija koja je sprovedena u Brazilu na većem uzorku (109 pacijenata) potvrđuje da je povišena ekspresija ciklina D1 u korelaciji sa dobrom prognozom, ali multivarijantna analiza nije potvrdila da je ciklin D1 nezavisan prognostički faktor za RCC (Lima i sar., 2014). Nizak nivo ekspresije ciklina D1 i p27 kod svetloćelijskog tipa udružen sa lošijom prognozom pokazali su i Hedberg i saradnici na uzorku koji je obuhvatao 127 muškaraca i 91 ženu sa dijagnostikovanim RCC (Hedberg i sar., 2003). Studija sprovedena u grupi pacijenata obolelih od karcinoma pluća pokazala je da je povišena ekspresija ciklina D1 udružena sa kraćim preživljavanjem u zavisnosti od histološkog tipa (bez recidiva), tako da u grupi kod kojih je dijagnostikovano adenokarcinomom pluća prognoza je lošija, dok to nije slučaj u grupi pacijenata sa skvamocelularnim karcinomom pluća, i ovi rezultati su statistički značajni (Lee i sar., 2015). Ekspresija gena CCND je pokazala zanimljiv rezultat u odnosu na papilarni histološki tip- trećina ispitanika ima deleciju, dok kod ostalih histoloških tipova dominira normalan nivo ekspresije, i to sa značajnošću blizu signifikantne. Ekspresija ciklina D1 zabeležena je u 40% slučajeva karcinoma dojke (Dickson i sar., 1995). Iz prikazanih rezultata vidimo da se medijana p16, kao i procenat pacijenata sa ekspresijom p16>10% povećava sa starenjem i kod pacijenata kod kojih je nastupio smrtni ishod. U uzorku iz ove studije nije nađena statistička značajnost u odnosu na ispitivane kliničko-morfološke parametre, izuzev kod histološkog tipa. Pokazano je da inaktivacija p15 i p16 proteina ima ulogu u nastanku RCC kod pacova mehanizmom oksidativnog stresa (Tanaka i sar., 1999). Svi pacijenti sa papilarnim histološkim tipom imaju visoku ekspresiju proteina p16. Papilarni histološki tip karcinoma bubrežnih ćelija češće ima deleciju gena CDKN2A, što je statistički značajno, u odnosu na druge zastupljene histološke varijante. Jasno je da su ovi rezultati na neki način u suprotnosti, jer u papilarnom histološkom tipu postoji značajan nivo delecije gena i isto tako značajan nivo povišene ekspresije proteina koji ga kodira. Postoje rezultati drugih studija koji ukazuju na

značaj hipermetilacije gena koji kodira p16 u približno 23% slučajeva kod pacijenata sa karcinomom bubrežnih ćelija i kod kojih nije detektovan p16, dok je u istom uzorku zabeležena smanjena ekspresija p16 u više od 50% ispitanika, što ukazuje da je kod njih verovatno u pitanju drugi mehanizam regulacije. Dobijeni rezultati ukazivali su na bolju prognozu (Vidaurreta i sar., 2008). Kod pacijenata sa visokom ekspresijom proteina p16 zabeleženo je kraće preživljavanje i češći smrtni ishod. Pacijenti sa delecijom gena imaju bolji klinički ishod, takođe bez statističke značajnosti. U studiji koja je obuhvatila 397 pacijenata nakon nefrektomije, autori su dosli do zaključka da nedostatak p16 u tumorskim ćelijama ukazuje na ulogu p16 u tumorigenezi, kao i da povišen nivo ekspresije ukazuje na bolje preživljavanje (Ikuerowo i sar., 2007). Studija koja se bavila ulogom proteina p16 u preživljavanju kod pacijenata sa karcinomom želuca ističe da je preživljavanje bez ponovnog javljanja bolesti znatno kraće kod p16-negativnih pacijenata ( $p < 0,001$ ) (Ma i sar., 2012). Kod 547 pacijenata sa karcinomom orofarinksa, pored drugih faktora (starost, pušenje, stadijum bolesti, pol i drugi kliničko-morfološki parametri od značaja), analiziran je i p16 status. Rezultati su govorili u prilog činjenici da je p16-negativan status pacijenta udružen sa pojavom udaljenih metastaza (Beitler i sar., 2019). U odnosu na sve ispitivane karakteristike, ekspresiju proteina p57 > 5% imaju u većem procentu ispitanici muškog pola, starije životne dobi, sa svetloćelijskim histološkim tipom i sa većim dimenzijama tumora. Visoku ekspresiju proteina i pretežno normalan nivo ekspresije gena CDKN1C imaju u većem procentu pacijenti kod kojih je nastupio smrtni ishod. Dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima studije koja je ispitivala imunohistohemijsku ekspresiju ciklina D, ciklina E, p16, p21, p27, p53 i p57 kod pacijenata sa karcinomom bubrežnih ćelija, na velikom uzorku od 452 pacijenta, s tim što su svi pacijenti obuhvaćeni ovom studijom imali dijagnostikovani svetloćelijski histološki tip. Pacijenti su praćeni u proseku tokom perioda od 24 meseca, i kod svih je određen prognostički marker-skor, koji je smatran nepovoljnim ukoliko je ustanovljena alteracija više od 4 ispitivanih proteina ćelijskog ciklusa (Gayed i sar., 2013). Autori su u zaključku istakli da je kumulativan broj aberantno ekspimiranih proteina ćelijskog ciklusa u korelaciji sa lošijim ishodom i generalno težom kliničkom slikom, a rezultati ove disertacije govore u prilog pomenutog zaključka.

## **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

Dragana Latic, Sanja Radojevic-Skodric, Srdjan Nikolic, Mirjana Prvanovic, Miodrag Lazic, Zoran Dzamic, Ljiljana Bogdanovic, Milena Radunovic, Marina Vukovic. Immunohistochemical study of cyclin A and p16 expression in patients with renal cell carcinoma. JBUON 2017; 22(5): 1322-1327.

Dragana Latic, Snezana Pejic, Slavisa Savic, Zlatibor Loncar, Ivan M. Nikolic, Gorana Nikolic, Ivan Pavlovic, Sanja Radojevic-Skodric. Cyclin D1 and p57 expression in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in patients with renal cell carcinoma. JBUON 2019; 24(1): 301-309.

## **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „Ispitivanje ekspresije proteina ćelijskog ciklusa kod bolesnika sa karcinomom bubrežnih ćelija“ dr Dragane Latić predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju povezanosti ekspresije odabranih proteina ključnih tačaka ćelijskog ciklusa i nastanka karcinoma bubrežnih ćelija i njegovih histoloških tipova, i ističe značaj ekspresije u odnosu na prognozu bolesti, TNM stadijum i nuklearni gradus. Imunohistohemijskom analizom, kao i analizom ekspresije odgovarajućih gena pomoću qRt-PCR, te korelacijom rezultata, dobijeni su vredni podaci pomoću kojih se mogu nastaviti istraživanja vezana za utvrđivanje preciznog tumor-markera, kao i prediktora preživljavanja. Rezultati sprovedenog istraživanja mogu poslužiti za dalja istraživanja ocene uspešnosti nekog terapijskog postupka, ali i za praćenje pacijenata kroz duži vremenski period.

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 Dragane Latić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 06.05.2019.

Članovi Komisije:

Mentor:

Prof. dr Ivana Novaković

Prof. dr Sanja Radojević-Škodrić

---

---

Prof. dr Miodrag Radunović

---

Prof. dr Nada Tomanović

---