

**NASTAVNO – NAUČNOM VEĆU STOMATOLOŠKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na petoj redovnoj sednici Nastavno – naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 09.04.2019. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

dr Vesna Danilović, redovni profesor, Stomatološki fakultet, Beograd

dr Zvezdana Tepavčević, redovni profesor, Stomatološki fakultet, Beograd

dr Zoran Jezdić, docent, Stomatološki fakultet, Beograd

dr Boban Aničić, docent, Stomatološki fakultet, Beograd

dr Gordana Nikčević, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „**IN-VITRO ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA MATIČNOSTI ĆELIJA POREKLOM OD ORALNOG PLANOCELULARNOG KARCINOMA**“

Kandidat: dr **Miloš Lazarević**

Mentori:

Prof. dr **Jelena Milašin**

Doc. dr **Milan Petrović**

Imenovana Komisija je proučila doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno – naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

**IZVEŠTAJ**

Kandidat Miloš M. Lazarević rođen je 31.08.1988. godine u Leskovcu, Republika Srbija. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2007. godine i diplomirao u januaru 2013. sa prosečnom ocenom 9,69. Lekarski staž obavio je na Stomatološkom fakultetu u Beogradu, a državni ispit je položio u martu 2014. godine. Doktorske studije je upisao u oktobru 2013. godine i položio sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00. Od februara 2017. godine angažovan je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Vlade Republike Srbije, pod nazivom “Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije”, evidencioni broj 175075. Od školske 2017/2018. godine angažovan je u obavljanju praktične nastave na predmetu Opšta i oralna patologija, u okviru integrisanih akademskih studija Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Do sada je objavio 7 radova na SCI listi.

## A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Miloša Lazarevića pod nazivom „*In-vitro* ispitivanje karakteristika matičnosti ćelija poreklom od oralnog planocelularnog karcinoma“ napisana je na 123 strane i ilustrovana sa 28 tabela i 29 slika.

Disertacija sadrži: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, uvod, ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaključke, literaturu i priloge.

U prvom delu **Uvoda** kandidat detaljno opisuje epidemiologiju i etiologiju oralnog planocelularnog karcinoma, kao i njegovu kliničku i patološku sliku i faktore rizika. Posebno je istaknut značaj hirurških margina tumora u lečenju pacijenata sa OPK i problem neadekvatnih definicija jasne margine, odnosno hirurške resekcije, iako je kvalitet hirurške resekcije presudan za lokalnu kontrolu i prognozu bolesti. U nastavku Uvoda objašnjava se hipoteza matičnih ćelija kancera, po kojoj tumorsko tkivo ima različitu hijerarhiju ćelija, a samo mala populacija ćelija ima sposobnost da inicira pojavu karcinoma. Kancerske matične ćelije (KMĆ) imaju kapacitet samo-obnavljanja i smatraju se subpopulacijom ćelija koje su odgovorne za inicijaciju, progresiju i metastaziranje tumora. U sklopu ovog poglavlja dat je opširan opis markera matičnosti, kao i drugih karakteristika na osnovu kojih se može sa relativnom sigurnošću dokazati postojanje ovih malih populacija KMĆ. Kandidat ukazuje na činjenicu da su do sada studije bile fokusirane isključivo na izolaciju i karakterizaciju KMĆ unutar samog tumora, dok su margine tumora bile zanemarene, iako je poznato da histološki i molekularni status margina tumora može imati presudan uticaj na tok bolesti.

U poglavlju **Ciljevi istraživanja** precizno su definisani hipoteza istraživanja i ciljevi studije. Ciljevi istraživanja su:

1. Optimizacija uslova ćelijske izolacije, kultivacije i propagacije, odnosno generisanje primarnih kultura ćelija iz oralnog planocelularnog karcinoma i tkiva margine poreklom od istog pacijenta;

2. Fenotipska karakterizacija ćelija tumora i margina u kulturi tokom pasaža, sledećim pristupima:

- određivanjem prisustva markera kancerske matičnosti, upotrebom protočne citometrije (CD44, CD90, CD73),

- analizom matičnosti preko ekspresije odgovarajućih markera (CD44, CD133, Oct-4, Sox2, Nanog) metodom real-time PCR-a i imunocitohemijski (CD44)

- određivanjem biohemijskog sadržaja ćelija upotrebom Raman spektroskopije

- određivanjem klonogenog, proliferativnog i migratornog potencijala izolovanih ćelija primenom istoimenih testova;

3. Ispitivanje markera epitelno-mezenhimske tranzicije kancerskih ćelija primenom sledećih metoda:

- imunohistohemijski (Vimentin, αSMA, SNAIL, SLUG )

- real-time PCR metodom (N-kadherin, E-kadherin, Vimentin, αSMA, SNAIL, SLUG);

4. Određivanje stepena rezistentnosti / senzitivnosti ćelija u kulturi na antineoplastične agense.

Hipoteza:

- (a) u tkivu tumora, a potencijalno i u tkivu tumorske margine, postoje ćelije odgovorne za inicijaciju i održavanje tumora, odnosno kancerske matične ćelije;
- (b) da se ćelijske populacije u tumorima i tumorskim marginama razlikuju u pogledu bitnih bioloških karakteristika kao što su stepen diferencijacije, kapacitet proliferacije i migracije i samoobnavljanja,
- (c) da se fenotipske karakteristike i tumorskih i ćelija margine odražavaju na ponašanje tumora.

U poglavlju **Materijal i metode** detaljno je opisan način izolacije i kultivisanja ćelija iz uzoraka oralnih planocelularnih karcinoma i tkiva tumorskih margina pacijenata operisanih na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Margine tumora su uzete 5 mm od ivica resekcije tumora. Margine su potvrđene kao histološki negativne tj. bez prisustva neoplastičnih ćelija. Histopatološka analiza rađena prema smernicama Svetske zdravstvene organizacije, koristeći hematoksilin i eozin bojenje. Ukupno je generisano 12 primarnih ćelijskih kultura poreklom od šest pacijenata. Ćelije su gajene u DMEM-u sa dodatkom 10% FBS i AB, u T75 bocama za ćelijske kulture, na 37 °C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>, a pasažirane su neposredno pre postizanja konfluentnosti od 80%. U eksperimentima je kao pozitivna kontrola, korišćena ćelijska linija oralnog planocelularnog karcinoma jezika SCC-25. Fibroblasti gingive zdravog pacijenta su korišćeni kao negativna kontrola. U ovoj studiji za sve eksperimente korišćenesu ćelije prve i pete pasaže.

Neposredno pre pasaže, ukupan broj ćelija, broj živih i mrtvih ćelija, vijabilnost i prosečna veličina živih i mrtvih ćelija bile su određivane pomoću Countess™ Automated Cell Counter-a. Ćelijske kulture su analizirane protočnom citometrijom za utvrđivanje prisustva markera CD44, CD90, CD73, a zatim i primenom reakcije polimeraze u realnom vremenu (real-time PCR) u cilju određivanja nivoa genske ekspresije sledećih markera matičnosti: CD44, CD133, Oct-4, Sox2 i Nanog. Prisustvo markera KMĆ, CD44 provereno je i imunocitohemijskom metodom. Kao nestandardna, dopunska metoda koja bi mogla da posluži za finijubiohemijsku karakterizaciju KMĆ, primenjena je ramanska spektroskopija koja ima sposobnost da otkrije suptilne razlike između ćelija na nivou molekula, atoma i atomskih veza. Određivanje ramanskih spektara je vršeno na talasnim dužinama između 400 i 2600 cm<sup>-1</sup> na aparatu Horiba Jobin Yvon Xplora. Kandidat je takođe koristio i standardne testove za dokazivanje matičnosti kao što je test formiranja sfera (sferoida) koji je rađen tako što su ćelije zasejane na pločama za ćelijske kulture koje su prethodno tretirane 1% agaroznim gelom sa DMEM-om, kako bi se sprečila ćelijska adhezija za plastiku. Pored funkcionalnih testova (test proliferacije, migracije i stvaranja kolonija), MTT test je korišćen za procenu uticaja antineoplastičnih agenasa na proliferaciju ćelija. Ćelije su tretirane različitim koncentracijama 5-fluorouracila i BET inhibitorima (iBET 151, iBET 762 i JQ1) u rastućim dozama. Konačno, kandidat je analizirao i pojavu epitelno-mezenhimske tranzije, kao posredno dokazivanje karakteristika matičnosti, koristeći imunohistohemijsku analizu i analizu genske ekspresije sledećih markera: E-kadherin, N- kadherin, Vimentin, αSMA, SLUG i SNAIL.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani promena broja ćelija tokom pasaža i njihove morfološke osobine. Protočna citometrija je pokazala jasnu ekspresiju mezenhimskih markera kancerske matičnosti (CD44, CD73 i CD90). Pored toga, utvrđen je povećani nivo ekspresije ovih markera u petoj pasaži u poređenju sa ćelijama nakon prve pasaže. Slično tome i qPCR analiza je pokazala ekspresiju markera

KMĆ u tumorskim i ćelijama margina. Nivoi ekspresije svih markera KMĆ bili su veći u petoj pasaži ( $p < 0.05$ ) i u tumorskim i u ćelijama margina. CD44 je pokazao najveću ekspresiju u svim ćelijskim kulturama, dok je marker CD133 pokazao najnižu. Porast nivoa iRNK svih kancerskih markera tokom vremena (između prve i pete pasaže) ukazuje na činjenicu da je došlo do obogaćivanja kultura matičnim ćelijama. Imunocitohemijki, potvrđeno je prisustvo CD44 markera matičnosti KMĆ u tumorskim i ćelijama margina. I ćelije tumora i ćelije margina (sa izuzetkom marginalnih ćelija prve pasaže) su pokazale sposobnost da formiraju sferoide (sfere), što predstavlja test njihove sposobnosti samoobnavljanja. Sposobnost samoobnavljanja ćelija u petoj pasaži bila je veća u odnosu na ćelije dobijene nakon prve pasaže. Test formiranja kolonija pokazao je da i ćelije margina, kao i tumorske ćelije imaju sposobnost da formiraju kolonije. Nisu pronađene statistički značajne razlike u klonogenom potencijalu između jednih i drugih ćelija kao ni između pasaža.

Kao jedan od parametara agresivnosti tumorskih ćelija, ispitan je stepen epitelno-mezenhimske tranzicije, kako u histološkim preparatima pacijenata, tako i u ćelijskim kulturama tih istih pacijenata. U cilju utvrđivanja fenomena epitelno mezenhimske tranzicije, pokazana je ekspresija epitelnog (E-kadherin) i mezenhimalnih markera (N-kadherin, Vimentin,  $\alpha$ SMA, SNAIL, SLUG). Postojale su razlike u ekspresiji markera EMT između ćelija tumora i margine, ali bez statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ). Nivo ekspresije vimentina je bio viši u tumorskim i ćelijama margine na početku kultivacije (prva pasaža) nego u ćelijama pete pasaže, dok su nivoi ekspresije  $\alpha$ SMA i SNAIL bili viši u 5. pasaži u odnosu na prvu ( $p < 0.05$ ) i u tumorskim i u marginalnim ćelijama. Konačno, kandidat je ispitao rezistentnost ćelijskih kultura na dejstvo antineoplastičnih agenasa i ustanovio da su tumorske ćelije pete pasaže pokazivale značajno veću rezistenciju na 5-fluorouracil u poređenju sa tumorskim ćelijama prve pasaže. Taj trend je primećen i kod ćelija margine. SCC-25 ćelijska linija je pokazala najveći stepen hemorezistencije. Primarna ćelijska kultura pete pasaže je pokazala veću rezistenciju na dejstvo BET inhibitora u odnosu na SCC-25 ćelijsku liniju. Ipak, BET inhibitori su se pokazali efikasnim, odnosno nakon 7 dana delovanja pokazali su izuzetnu citotoksičnost koja je dovela do pada vijabiliteta ćelija na manje od 10%.

U poglavlju **Diskusija** su razmatrani problemi i solucije identifikacije i karakterizacija kancerskih matičnih ćelija kao i kratak osvrt na buduća ispitivanja. Hipoteza karcinomskih matičnih ćelija predstavlja fundamentalni pomak u našem razumevanju prirode i patogeneze karcinoma. Prema ovoj teoriji, samo jedna kancerska matična ćelija je sposobna da inicira formiranje tumora koji će tokom svoje evolucije postati skupina heterogenih ćelijskih populacija. Identifikacija kancerskih matičnih ćelija OPK je jedan od prvih koraka u otkrivanju prirode bolesti. Rasvetljavanje uloge biomarkera neophodno je kako bi se obezbedilo razumevanje patogeneze OPK. U ovoj studiji korišćena je cela paleta markera matičnosti- CD44, CD133, CD90, CD73, Oct-4, Sox2, Nanog kako bi se sa što većom sigurnošću dokazalo postojanje subpopulacija KMĆ u primarnim kulturama OPK. Specifičnost i značaj naše studije je u tome da su ovi markeri matičnosti takođe otkriveni u marginama oralnih karcinoma, odnosno u tkivu udaljenom 5mm od ivice tumora. Ovi rezultati sugerišu postojanje KMĆ i unutar tumorskih margina. Pronađeni su različiti nivoi ekspresije markera matičnosti. CD44, važan glikoprotein na površini karcinomskih ćelija, povezan sa ćelijskom adhezijom i migracijom, smatra se ključnim markerom KMĆ oralnog planocelularnog karcinoma. Njegov nivo ekspresije nije bio visok, što se može

objasniti činjenicom da KMĆ ne predstavljaju veliku subpopulaciju ćelija unutar OPK. Sposobnost formiranja sferoida, kao test tumorskog samoobnavljanja i kapaciteta rasta nezavisno od podloge, smatra se adekvatnom *in vitro* zamenom za *in vivo* eksperimente. Ovaj test se i ranije koristio za identifikaciju KMĆ unutar tumora, međutim nikada za tumorske margine. U našoj studiji, ćelije primarnih kultura margine i tumora imale su sposobnost stvaranja sfera, potvrđujući postojanje KMĆ u ćelijama margine u petoj pasaži. Međutim, zanimljivo je da ćelije margine prve pasaže nisu imale ovu sposobnost, što predstavlja značajnu razliku u odnosu na tumorske ćelije prve pasaže. Pojava sfera u petoj pasaži sugeriše na obogaćivanje kulture subpopulacijom kancerskih matičnih ćelija.

**Zaključci** su izneti sažeto i jasno, po redosledu prikazanih rezultata:

1. Uspostavljen je protokol izolacije i kulture ćelija poreklom od oralnog planocelularnog karcinoma i tkiva tumorske margine;
2. U ćelijskim kulturama poreklom od tumora i od margine utvrđeno je prisustvo kancerskih matičnih ćelija, sudeći po ekspresiji specifičnih markera (CD133, Nanog, Sox2, CD44 i Oct4). Rezultati real-time PCR analize genske ekspresije, potvrđeni su dodatno i protočnom citometrijom u kojoj su ispitani markeri matičnosti CD44, CD73 i CD90;
3. Tokom pasaža broj kancerskih matičnih ćelija je rastao, odnosno uvećavala se ekspresija specifičnih markera u obe vrste kultura.
4. Kao dopunska karakteristika matičnost, a takođe i parametar tumorske agresivnosti, u obe vrste ćelijskih kultura pokazana je ekspresija markera epitelno-mezenhimske tranzicije (E-kadherin, N-kadherin, Vimentin, αSMA, SNAIL, SLUG);
5. I tumorske ćelije i ćelije margina su pokazale sposobnost formiranja kolonija, proliferacije i migracije, koje su se menjale tokom pasaža;
6. Ćelije u obe vrste kultura su imale sposobnost samo-obnavljanja što je pokazano testom formiranja sferoida, a ta sposobnost bila je izraženija u petoj pasaži u odnosu na prvu pasažu; ovo predstavlja još jednu potvrdu prisustva KMĆ u kulturama, kao i obogaćivanja kultura kancerskim matičnim ćelijama tokom vremena;
7. Oba tipa ćelijskih kultura su pokazala rezistenciju na antineoplastične agense, a hemoresistencija je bila izraženija u kulturama pete pasaže u odnosu na kulture prve pasaže;

Iz svega navedenog proističe zaključak o velikoj sličnosti tumora i tumorskih margina u pogledu njihovih ćelijskih i molekularnih karakteristika *in vitro*.

Poglavlje **Literatura** sadrži spisak od 200 adekvatno citiranih referenci iz relevantne naučne literature. U prilogima su priloženi Informator za pacijente kao i pisana saglasnost.

## **B. Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

**Lazarevic M.**, Milosevic M., Trisic D., Toljic B., Simonovic J., Nikolic N., Mikovic N., Jelovac D., Petrovic M., Vukadinovic M., Milasin J. Putative cancer stem cells are present in surgical margin of oral squamous cell carcinoma. J BUON. 2018; 23(6): 1686-1692. (M23) (IF= 1.766)

Baldan F., Allegri L., **Lazarevic M.**, Catia M., Milosevic M., Damante G., Milasin J. Biological and molecular effects of bromodomain and extra-terminal (BET) inhibitors JQ1, IBET-151, and IBET-762 in OSCC cells. J Oral Pathol Med. 2019; Mar; 48(3):214-221. doi: 10.1111/jop.12824. (M21) (IF=2.237)

**Saopštenja sa domaćeg skupa štampano u izvodukoji čine deo doktorske disertacije:**

**Lazarevic M.**, Milosevic M., Petrovic M., Milasin J. Sphere forming assay of oral cancer cells (*Serbian*). The 16<sup>th</sup> Serbian Dental Congress with International Participation, Serbia, Belgrade 2017. (M64)

**Lazarevic M.** *In vitro* assessment of stemness of oral cancer cells. The 69<sup>th</sup> anniversary of School of Dental Medicine, University of Belgrade, Serbia, Belgrade 2017. (M64)

**Lazarevic M.**, Petrovic M. The effect of freezing oral squamocellular carcinoma on the cell viability of primary cultures (*Serbian*). The 67<sup>th</sup> anniversary of School of Dental Medicine University of Belgrade, Serbia, Belgrade 2015. (M64)

**C. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „***In-vitro* ispitivanje karakteristika matičnosti ćelija poreklom od oralnog planocelularnog karcinoma**“ dr Miloša Lazarevića predstavlja značajan i originalan naučni doprinos ispitivanju biologije oralnog planocelularnog karcinoma, uz posebnu pažnju posvećenu prisustvu kancerskih matičnih ćelija u tumorskim marginama. Izuzetno su retki radovi i u svetskoj literaturi koji su se bavili ovom problematikom.

Doktorska disertacija dr Miloša Lazarevića urađena je prema svim principima naučnog istraživanja, sa precizno postavljenim ciljevima, originalnim naučnim pristupom, savremenom metodologijom rada, adekvatno prikazanim i diskutovanim rezultatima i jasno uobličnim zaključcima.

Nakon uvida u dostavljeni tekst komisija je jednoglasno ocenila da doktorska disertacija pod nazivom „***In-vitro* ispitivanje karakteristika matičnosti ćelija poreklom od oralnog planocelularnog karcinoma**“ dr Miloša Lazarevića predstavlja originalno, samostalno i dobro dokumentovano istraživanje.

Doktorska disertacija ispunjava sve kriterijume propisane Zakonom o Univerzitetu i statutima Univerziteta i Stomatološkog fakulteta u Beogradu.

Na osnovu svega napred navedenog, Komisija predlaže Nastavno – naučnom veću

Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Miloša Lazarevića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka stomatologije.

U Beogradu, \_\_\_\_\_

Članovi Komisije:

---

**Prof. dr Vesna Danilović**

Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

---

**Prof. dr Zvezdana Tepavčević**

Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

---

**Doc. dr Zoran Jezdić**

Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

---

**Doc. dr Boban Aničić**

Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

---

**Naučni savetnik dr Gordana Nikčević,**

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu