

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj dana 18.04.2019. godine, broj 9700/03-MC, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Ispitivanje uloge *AIP* gena u patogenezi adenoma hipofize na životinjskom i ljudskom modelu“

kandidata mr dr Marka Stojanovića, zaposlenog u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije.

Mentor je Prof dr Vera Popović a Komentor Prof. dr Márta Korbonits

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

- 1. Prof dr Milan Petakov, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu**
- 2. Prof. dr Milica Medić Stojanoska, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu**
- 3. Doc dr Dragana Miljić, docent 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 Marka Stojanovića napisana je na ukupno 97 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi istraživanja na životinjskom modelu, Materijal i metodologija istraživanja na životinjskom modelu, Rezultati istraživanja na životinjskom modelu, Diskusija rezultata istraživanja na životinjskom modelu, Zaključak istraživanja na životinjskom modelu, Ciljevi istraživanja na ljudskom modelu, Materijal i metodologija istraživanja na ljudskom modelu, Rezultati istraživanja na ljudskom modelu, Diskusija rezultata istraživanja na ljudskom modelu, Zaključak istraživanja na ljudskom modelu, Zaključci i Literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 17 tabela, 5 grafikona i 38 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 su adenomi hipofize, koji je njihov patofiziološki i epidemiološki značaj. Koncizno su izložena dosadašnja saznanja o patogenezi adenoma hipofize i naznačena nedovoljna rasvetljenost ovog problema. Objasnjena su osnovna saznanja o *AIP* (protein koji interreaguje sa aril-hidrokarbon receptorom) genu i njegovoj mogućoj povezanosti sa patogenezom adenoma hipofize.

Glavnica doktorske teze je podeljena u dve celine koje se odnose na eksperimentalni deo sproveden na životinjskom modelu i deo sproveden na ljudskom modelu. Svaki od ova dva dela obrađen je kroz zaseban uvod, ciljeve istraživanja, materijal i metodologiju, rezultate, diskusiju rezultata i zaključak.

U **uvodu za eksperimentalni deo na životinjskom modelu** predstavljeni su rezultati prethodnih istraživanja inaktivacije *AIP* gena na životinjskom modelu. Izložene su osnovne odlike i komparativne prednosti riba zebrića (*Danio rerio*) kao eksperimentalnog modela. Predstavljen je mehanizam, prednosti i nedostaci morfolino tehnike eksperimentalne genske inaktivacije korišćene u ovoj disertaciji.

Ciljevi istraživanja na životinjskom modelu precizno su definisani. Sastoje se od demonstriranja na životinjskom modelu zebrića da je *AIP* gen eksprimiran u hipofizi, zatim ispitivanja posledica inaktivacije *AIP* gena na rast i razvoj embriona zebrića i ispitivanja posledice inaktivacije *AIP* gena na nivou hipofize zebrića.

Materijal i metodologija istraživanja na životinjskom modelu objašnjavaju da su eksperimenti na životinjskom modelu sprovedeni u saradnji sa *William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London* i *Royal Veterinary College, University of London* (u toku studijskog boravka doktoranta), izlažu osnove rada sa eksperimentalnim modelom zebrića, detaljno objašnjavaju način primene morfolino tehnike genske inaktivacije *AIP* i osnove metoda *Whole mount in situ hibridizacije* za *AIP* kojom je ispitivana *AIP* ekspresija kod intaktnih jedinki a dokazivana uspešna inaktivacija kod eksperimentalnih jedinki i metode *Whole mount imnobojenja* za *PRL* i *HR* kojom je analizirana promena oblika, veličine i položaja hipofize kod jedinki za *AIP* genskom inaktivacijom.

U poglavlju *Rezultati istraživanja na životinjskom modelu* detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati tekstualno i grafički kroz tabele, grafikone i ilustracije reprezentativnih eksperimentalnih jedinki.

Diskusija rezultata na životinjskom modelu je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom rezultata doktorske disertacije dobijenih na eksperimentima na životinjskom modelu.

Zaključak istraživanja na životinjskom modelu sažeto prikazuje najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada na životinjskom modelu.

U *uvodu za eksperimentalni deo na ljudskom modelu* jasno i koncizno su predstavljena dosadašnja saznanja o AIP proteinu, njegovim interakcijama sa drugim proteinima i njegovim mogućim ulogama. Prikazani su drugi primeri paradigme o sekretornim produktima tumor supresornih gena. Na osnovu prethodnih istraživanja o strukturi i unutarćelijskoj lokalizaciji AIP proteina u sekretornim vezikulama somatotrofa predstavljena je osnova za hipotezu o sekretornoj prirodi AIP proteina i mogućoj kosekreciji sa hormonom rasta.

Ciljevi istraživanja na ljudskom modelu precizno su definisani. Sastoje se od ispitivanja uticaja pola, uzrasta i uhranjenosti na serumsku koncentraciju AIP proteina; ispitivanja razlike u serumskoj koncentraciji AIP proteina između ispitanika sa nedostatkom sekrecije hormona rasta (HR), sa očuvanom sekrecijom HR i onih sa nekontrolisanom hipersekrecijom HR (akromegalija); ispitivanja povezanosti serumskih koncentracija AIP i HR bazno i u toku dinamskih testova stimulacije HR (ITT) ili supresije HR (OGTT); ispitivanja povezanosti serumskih koncentracija AIP i PRL bazno i u toku testa stimulacije sekrecije PRL (ITT); ispitivanja povezanost serumskih koncentracija AIP i kortizola bazno i u toku testa stimulacije sekrecije kortizola (ITT); ispitivanja dinamičkog uticaja hipoglikemije (tokom ITT) i hiperglikemije (tokom OGTT) na serumske koncentracije AIP.

Pacijenti i metodologija istraživanja na ljudskom modelu objašnjavaju da je istraživanje sprovedeno na Odeljenju neuroendokrinologije, Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Srbije, na 88 ispitanika uključujući pacijente sa deficitom HR, kontrolne pacijente sa očuvanom sekrecijom HR, pacijente sa aktivnom akromegalijom i kontrolne pacijente sa očuvanom supresibilnošću HR. Objasnjena je primena testa stimulacije sekrecije HR (ITT) i supresije HR (OGTT) uz analizu serumskog HR (u oba testa) kortizola i PRL (u ITT) paralelno sa analizom serumskog AIP koja je po prvi put sprovedena primenom imunoseja za AIP razvijenog za potrebe ove disertacije u saradnji sa *Department of Medicine*

for Endocrinology, Diabetes and Nutritional Medicine, Charité Universitätsmedizin, Berlin. 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.

U poglavlju **Rezultati istraživanja na ljudskom modelu** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati tekstualno i grafički kroz tabele i grafikone.

Diskusija rezultata na ljudskom modelu je napisana jasno i pregledno, uz pregled rezultata doktorske disertacije dobijenih na ljudskom modelu, uz sveobuhvatnu i temeljnu diskusiju mogućih objašnjenja dobijenih rezultata u svetlu drugih relevantnih istraživanja.

Zaključak na ljudskom modelu sažeto prikazuje najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada na ljudskom modelu.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata celokupnog rada na životinjskom i na ljudskom modelu.

Korišćena **literatura** je adekvatna i sadrži spisak od 99 relevantnih referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Na eksperimentalnom modelu ribe zebrica (*Danio rerio*) pokazana je metodom *whole mount in situ* hibridizacije (WISH) široka ekspresija AIP gena uključujući ali ne samo u regiji hipofize. Sprovedena je inaktivacija AIP gena u jednoćelijskom stadijumu embrionalnog razvoja zebrice primenom morfolino metode antisense oligonukleotida. Uspešnost inaktivacije je ispitivana WISH metodom i potvrđena odustvom ekspresije AIP kod eksperimentalnih jedinki. Morfometrijskim praćenjem razvoja embriona zebrice sa inaktivacijom AIP pokazan je zastoj u rastu, malformacije na nivou perikarda, srednjeg mozga, i ribljeg mehura ukazujući na rasprostranjenu i značajnu ulogu AIP gena u preživljanju. Analizom površine PRL imunobojenja na nivou hipofize u stadijumu pet dana nakon oplođenja uočene su: uvećanje hipofize i tranzicija ka okruglom obliku i ventralnijem položaju u odnosu na neizmenjene jedinke, ukazujući na hipofiznu hiperplaziju u odsutvu AIP gena.

Primenom namenski razvijenog autohtonog imunometrijskog eseja, serumski AIP protein je po prvi put uspešno i pouzdano meren kod svih 88 ispitanika u 5 vremenskih

uzoraka u dinamskim testovima. Kod svih ispitanika je koncentracija serumskog AIP konzistentno bila reda veličine 0,1 ng/ml. Analizom serumskog AIP bazno i u testovima stimulacije i supresije hormona rasta (HR) kod pacijenata sa deficitom HR, kontrolnih pacijenata sa očuvanom sekrecijom HR, pacijenata sa aktivnom akromegalijom i kontrolnih pacijenata sa normalnom supresibilnošću HR dobijeni su sledeći rezultati: Bazne vrednosti AIP bile su nezavisne od uzrasta, pola i ITM. Serumski AIP je u svim ispitivanim grupama bio stabilan u uzorcima uzetim u intervalima od 30 minuta tokom 2 sata, i nije se menjao pod uticajem značajne hipoglikemije (u ITT testu) ili hiperglikemije (u OGTT). Serumske koncentracije AIP bile su nezavisne od koncentracije HR bilo bazno ili pri stimulaciji sekrecije HR (u ITT) ili pri supresiji sekrecije HR (u OGTT). Nije bilo značajne razlike u vrednostima AIP (baznoj, maksimalnoj ili integrisanoj) između ispitanika sa deficitom HR (DHR) i ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR (NDHR), niti između ispitanika sa nesupresibilnom hipersekrecijom HR u aktivnoj akromegaliji (AA) naspram ispitanika sa očuvanom supresibilnošću HR (OSHR). Koncentracije serumskog AIP i HR nisu značajno korelirale niti bazno, niti u toku ITT ili OGTT. Rezultati sprovedenog istraživanja direktno pokazuju da je AIP protein merljivo prisutan i stabilan u ljudskoj cirkulaciji tokom vremena (pet uzoraka unutar 2h) i da nije podložan uticaju značajne hipoglikemije ili hiperglikemije, značajnog porasta HR, kortizola i PRL (direktno pokazano) ili ACTH (indirektno, na osnovu fiziologije odgovora osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubreg u ITT).

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Na prethodnim eksperimentima na životinjama (od insekata do glodara) sa inaktivacijom *AIP* gena pokazana je rana embironalna ili larvalna smrtnost, ukazujući na značaj ovog gena. (Aflorei ED, *et al* 2018) (Lin BC *et al* 2007) Neke od ranije pokazanih specifičnih malformacija (mozga i perikarda) su rekapitulirane životinjskim modelom zebrice korišćenim u ovoj disertaciji. Sveukupni zastoj u rastu i opisane malformacije potvrđuju rasprostranjen značaj *AIP* gena. U ovom istraživanju pokazana je da ekspresija *AIP* gena obuhvata i regiju hipofize. U ovoj disertaciji korišćena je morfolino metoda genske inaktivacije, kod koje se može očekivati tranzitorna inaktivacija i fenotipski spektar, što ima predosti kod gena kao što je *AIP* čiji potpuni nedostatak vodi ranoj smrtnosti. (McGonnel IM, *et al* 2006) Prednost zebrice kao modela leži u jednostavnosti uzgajanja i eksperimentalnog rada, brzom i simultanom razvoju transparentnih embriona, a uz pokazanu adekvatnu homologiju sa ljudskim neuroendokrinim sistemom. (McGonnel IM, *et al* 2006)

Prethodna istraživanja uloge *AIP* gena u patogenezi adenoma hipofize na životinjskom modelu pokazala su na modelu glodara (sa heterozigotnom *AIP* inaktivacijom) nastanak adenoma hipofize (AH) sa visokom penetrantnošću ali u uzrastu koji odgovara ljudskoj starosti od oko 50 godina. (Raitila A *et al*, 2010) (Gillam MP *et al*. 2017). Tim modelom nije u potpunosti rekapituliran humani fenotip sa pojavom AH u ranijem uzrastu. Na modelu glodara pokazana je i hiperplazija kao prethodnica pojave AH, kao i pojava anomalija na nivou perikarda i kranijalne vaskularizacije. (Lecoq AL *et al* 2016) (Lin BC *et al* 2007). Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije ukazuju na ranu pojavu promena na nivou hipofize (komparativno ranije nego na modelu glodara - što bolje rekapitulira ljudski FIPA fenotip) koje su samo morfometrijski opisane i praćene (kao uvećanje, promena oblika i položaja – na osnovu površine PRL imunobojenja) ali ukazuju na povećanu proliferativnu aktivnost na nivou hipofize (moguću hiperplaziju ili tumor) sa visokom prevalencom. Ovakvi nalazi podupiru pretpostavke o tumor-supresorskoj ulozi *AIP* gena na nivou hipofize i ukazuju na hiperplaziju kao fazu koja prethodi patogenezi AH. Praćena je pojava malformacija opisanih kod drugih životinjskih modela *AIP* inaktivacije (perikardne i cerebralne anomalije) što govori o velikom i rasporstanjenom značaju *AIP* gena ali i o adekvatnosti i primenjivosti životinjskog modela razvijenog u ovoj doktorskoj disertaciji.

Izvor, uloga i značaj cirkulišućeg AIP proteina nisu ranije ispitivani. U objavljenoj literaturi nema podataka o istraživanjima koja su uključivala imunometrijsku analizu serumskog AIP. Prethodna istraživanja pokazala su sekretornu prirodu drugih imunofilina srodnih AIP (n.pr FKBPL ili Ciklofilin A). (Zhang M, *et al* 2018) (Valentine A, *et al* 2011). Takođe je pokazna sekretorna priroda za produkte drugih tumor supresornih gena (n.pr. EPHA7, maspin i galanin) (Mansour MR, *et al* 2011) (Dean I, *et al* 2017) (Bauer FE, *et al* 1986) U ovoj doktorskoj disertaciji serumski AIP protein analiziran je po prvi put imunometrijskom metodom. Potvrđeno je njegovo stabilno prisustvo u humanoj cirkulaciji, nezavisno od pola, uzrasta ili uhranjenosti, u koncentraciji reda veličine 0,1ng/ml. Pokazano je odsustvo uticaja hiperglikemije ili hipoglikemije na koncentraciju serumskog AIP. U jednom prethodnom istraživanju baziranom na proteomičkoj metodi, pokazan je značajan postprandijalni porast AIP u plazmi kod podgrupe gojaznih osoba. (Trush AB, *et al* 2018) U ovoj disertaciji, pokazano je da je serumski AIP nezavistan od uhranjenosti (ITM) ispitanika i da na njegovu koncentraciju ne utiče oralno opterećenje glukozom (OGTT).

U prethodnim istraživanjima metodama elektromikroskopije i dvostruke imunofluorescencije pokazana je kolokalizacija AIP sa HR u sekretornim vezikulama

somatotrofa. (Leontiu CA *et al* 2008) Pored toga nekoliko *in vitro* studija pokazalo je smanjenje bazalne ili stimulisane sekrecije HR nakon *AIP* inaktivacije. (Formosa R, *et al* 2013, Lecoq AL, *et al* 2016). Poznata je i strukturna sličnost *AIP* sa TRIP8b koji je uključen u oslobađanje ACTH. (Chen S, *et al* 2001) Pokazana je i povezanost *AIP* sa sinaptičkim vezikulama. (Chen B, *et al* 2017)

Nasuprot hipotezi baziranoj na prethodnim istraživanjima, rezultati ove disertacije su pokazali odsustvo očekivane kosekrecije *AIP* sa HR. Pokazano je odsustvo korelacije serumskog *AIP* i HR pri stimulacionim i supresivnim testovima sekrecije HR, kao i odsustvo razlike u baznim i dinamskim vrednostima *AIP* kod ispitanika sa očuvanom, neadekvatnom ili prekomernom sekrecijom HR. Pored ovoga, pokazano je u istim testovima da ni dinamika serumskog kortizola i ACTH ili PRL nemaju uticaja na koncentraciju serumskog *AIP*.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Marko Stojanovic, Zida Wu, Craig E Stiles, Dragana Miljic, Ivan Soldatovic, Sandra Pekic, Mirjana Doknic, Milan Petakov, Vera Popovic, Christian Strasburger, Márta Korbonits, Circulating aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (*AIP*) is independent of GH secretion *Endocr Connect.* 2019 Apr; 8(4): 326–337. Published online 2019 Mar 4. DOI: 10.1530/EC-19-0082

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Ispitivanje uloge *AIP* gena u patogenezi adenoma hipofize na životinjskom i ljudskom modelu“ dr Marka Stojanovića, predstavlja originalni naučni doprinos razumevanju patogeneze adnoma hipofize i uloge *AIP* proteina na nivou hipofize. Na eksperimentalnom modelu zebrice (*Danio rerio*) pokazano je da inaktivacija *AIP* gena dovodi do ranog uvećanja i izmene oblika i pozicije hipofize sugerišući tumor-supresorsku ulogu *AIP* gena na nivou hipofize. *AIP* protein je po prvi put pouzdano meren *in vivo* u ljudskom serumu imunometrijskom metodom. Pokazano je da je stabilno prisutan u serumu, nezavistan od pola, uzrasta, uhranjenosti, hiper ili hipoglikemije. Uprkos ranije dokazanoj kolokalizaciji u sekretornim vezikulama somatotrofa, pokazano je odsustvo bilo konstitutivne ili stimulisane kosekrecije HR i *AIP*. S obzirom na to da je *AIP* evolutivno visoko očuvan protein, široke rasprostranjenosti u organizmu i neophodan za preživljavanje, od velikog je značaja uspostavljena pouzdana platforma za imunometrijsku analizu njegove serumske koncentracije, i prvi koraci na putu razumevanja njegovog izvora, uloge i značaja.

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 Marka Stojanovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 17.06.2019.

Članovi Komisije:

Prof dr Milan Petakov

Prof. dr Milica Medić Stojanoska

Doc dr Dragana Miljić

Mentor:

Prof dr Vera Popović

Komentor:

Prof. dr Márta Korbonits

