

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04.2016. godine, broj 5940/4 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije kandidata dr Martina Bosić, asistenta na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod nazivom:

„Ekspresija proteina visoke mobilnosti grupe a (HMGA) i njihovih modulatora u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože”

Mentor doktorske disertacije je prof. dr Dimitrije Brašanac, redovni profesor na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Jasmina Marković Lipkovski, Institut za patologiju Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Milica Labudović-Borović, Institut za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Doc. dr Slaviša Đuričić, Katedra za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Banja Luci

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Martine Bosić pod nazivom **„Ekspresija proteina visoke mobilnosti grupe a (HMGA) i njihovih modulatora u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože”** napisana je na 98 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija,

zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 25 tabela i 14 slika. Sadržaj doktorske teze, zahvalnica i sažetak na srpskom i engleskom jeziku su prikazani na početku, dok se spisak skraćenica korišćenih u tekstu, biografija kandidata i prilozi nalaze na njenom kraju.

Uvod je napisan na 28 strana i sadrži šest slika i osam tabela. Podeljen je na osam poglavlja, koja su napisana jasno i koncizno. U prva četiri poglavlja su opisane kliničke i histopatološke karakteristike aktinične keratoze (AK), Bowen-ove bolesti (BD) i planocelularnog karcinoma kože (SCC), principi njihovog lečenja, kao i molekulske promene koje se javljaju u procesu kancerogeneze i nastanka ovih tumora kože. Peto poglavlje je posvećeno strukturi hromatina i epigenetskoj regulaciji transkripcije gena, koje su jasno i koncizno opisane, sa kratkim osvrtom na HMGA proteine, uz tabelarni prikaz i ilustraciju jednom slikom. Šesto poglavlje je posvećeno HMGA proteinima i sadrži dve slike i jednu tabelu. Opisana je struktura ove familije proteina, mehanizam njihovog dejstva i regulacije njihove aktivnosti, zatim uloga u razvoju normalnih tkiva i organa, odnosno tumora, kao i njihov dijagnostički značaj. U sedmom poglavlju opisani su proteini familije Protein arginin metiltransferaza, PRMT1 i PRMT6. Jasno i sažeto je opisana njihova struktura, mehanizmi dejstva i uloga u razvoju tkiva i organa, kao i kancerogenezi. Ovo poglavlje sadrži i dve slike i jednu tabelu. U osmom poglavlju su opisane acetil transferaze p300 i PCAF, njihova uloga u razvoju organa i kancerogenezi, kao i odnos sa HMGA proteinima.

Ciljevi istraživanja, napisani na jednoj strani, su jasno definisani, pri čemu su izdvojena četiri glavna cilja: 1. Ispitivanje ekspresije HMGA1a/1b, HMGA2, PRMT1, PRMT6, PCAF i p300/CBP u aktiničnoj keratozi, Bowen-ovoj bolesti i invazivnom planocelularnom karcinomu kože; 2. Analizira ispoljavanja HMGA proteina i njihovih modulatora u in situ lezijama klasifikovanim kao keratinocitna intraepidermalna neoplazija (KIN); 3. Korelacija ekspresije HMGA proteina i njihovih modulatora sa prognostičkim parametrima planocelularnog karcinoma kože – dimenzije, dubina invazije, debljina i gradus tumora; 4. Procena različitih načina evaluacije imunohistohemijskog bojenja i ekspresije HMGA proteina i njihovih modulatora u odnosu na tip lezije i prognostičke parametre.

Poglavlje **Materijal i metode** je napisano na devet strana i sadrži podatke o analiziranom uzorku, metodi konstrukcije tkivnog mikroniza, primenjenim metodama imunohistohemijskog i dvostrukog imunofluorescentnog bojenja i načinima njihove analize, i statističkoj obradi rezultata.

Detaljno je objašnjena tehnika konstrukcije tkivnog mikroniza, na čijim presecima su rađena imunohistohemijska bojenja sledećim primarnim antitelima: HMGA1a/1b, HMGA2, PRMT1, PRMT6, p300, PCAF, E-kaderin, vimentin i matriksna metaloproteinaza 9 (MMP9). U ovom poglavlju je opisana i metodologija analize obojenih preseka za svako primenjeno antitelo. Analiziran je broj pozitivnih ćelija (semikvantitativno) i distribucija tumorskih ćelija u tumorskim plažama. Za istraživanje je korišćen biopsijski materijal pacijenata sa AK, BD i SCC kože koji su hirurški tretirani i dijagnostikovani u periodu od 2002. do 2012. godine. Takođe je ispitivana korelacija prognostičkih parametara SCC kože (stepen diferentovanosti, dijametar, debljina, dubina invazije) sa imunohistohemijskim markerima (HMGA1a/1b, HMGA2, PRMT1, PRMT6, p300 i PCAF). Ovo poglavlje je upotpunjeno jednom slikom i sa tri tabele.

Poglavljje **rezultati** je napisano na 27 strana i u njemu su navedeni originalni podaci dobijeni u ovom istraživanju. Rezultati su pregledno i sistematično predstavljani kroz 13 tabela i sedam slika, uz potrebna objašnjenja u pratećem tekstu, i sistematizovani u skladu sa ciljevima istraživanja..

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

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 173 bibliografske jedinice, koje su poredane po redosledu po kome se citiraju u tekstu disertacije.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati se odnose na 307 pacijenata sa biopsijama tumora kože, koje su na osnovu histopatološke dijagnoze grupisane u 90 slučajeva AK, 50 BD i 167 SCC.

Ekspresija HMGA1a/1b proteina je bila odsutna ili niska u većini ispitanih slučajeva. Češće prisustvo HMGA1a/1b u SCC kože sugerise na ulogu ovog proteina u nastanku invazivnog SCC. Niska ekspresija i odsustvo razlika između AK i BD, kao i KIN različitog stepena ukazuje da HMGA1a/1b nema bitnu ulogu u nastanku preinvazivnih lezija epidermisa različitog stepena. Viša ekspresija HMGA1a/1b u slabo diferentovanim tumorima sugerise negativnu ulogu ovog proteina u dediferencijaciji i progresiji tumora.

Viša i difuzna ekspresija HMGA2 u SCC nego u in situ lezijama sugerišu značaj aktivacije ovog proteina u nastanku invazivnog tumora. Niži obim ekspresije HMGA2 u KIN lezijama niskog gradusa i varijabilna distribucija ekspresije ovog proteina u in situ lezijama govori u prilog njihove heterogenosti u pogledu ekspresije HMGA2 proteina i sugerišu njegovu ograničenu ulogu u progresiji in situ lezija iz nižeg u viši stepen. Razlike u distribuciji, ali ne i obimu ekspresije HMGA2 u odnosu na stepen diferentovanosti SCC, kao i odsustvo razlika u ekspresiji u odnosu na druge prognostičke parametre SCC sugerišu ulogu u progresiji tumora u smislu dediferencijacije, ali ne i razvoja invazivnog fenotipa.

Viša i difuzna ekspresija PRMT1 u BD i SCC uz sniženje ekspresije u slabije diferentovanim tumorima ukazuju na značaj aktivacije PRMT1 u nastanku in situ i inazivnog SCC kože, ali i na varijacije u ekspresiji ovog proteina. Takve varijacije bi mogle biti posledica složenih poremećaja u funkcionisanju njegovih brojnih molekularnih partnera. Suprotan smer varijacija ekspresije PRMT6 u ispitanim lezijama sugeriše značaj aktivacije PRMT6 u progresiji SCC kože. Takođe, kao i u slučaju PRMT1, varijacije u ekspresiji PRMT6 bi mogle biti posledica složenih poremećaja u funkcionisanju njegovih brojnih molekularnih partnera.

Nalazi značajno više i češće difuzne jedarne ekspresije p300 u SCC, kao i češće difuzne jedarne ekspresije ovog proteina u slabije diferentovanim tumorima, debljim tumorima i onim sa dubljom invazijom sugerišu ulogu aktivacije p300 kako u nastanku, tako i u dediferencijaciji i progresiji SCC kože. Udruženost visoke ekspresije p300 i aberantne ekspresije vimentina u SCC kože ukazuje na ulogu u epitelno-mezenhimnoj transformaciji kao mehanizmu progresije ovog tumora. Prisustvo citolazmatske ekspresije PCAF u većini ispitanih slučajeva ukazuje na rani poremećaj funkcije ovog proteina u kancerogenezi u epidermisu. Dodatno, gubitak jedarne ekspresije PCAF u SCC, kao i difuzna citoplazmatska ekspresija ovog proteina u SCC, naročito u slabo diferentovanim tipovima, govore u prilog izmenjene funkcije PCAF koja za posledicu ima poremećaj sazrevanja ćelija tj. dediferencijaciju.

Udruženo prisustvo HMGA1a/1b, odnosno njegove povišene ekspresije i visoke ekspresije PRMT1 u SCC kože sugerišu značaj koekspresije HMGA2 i PRMT1 u nastanku invazivnog SCC kože. Dalje, udružena povišena ekspresija HMGA2 i visoka ekspresija p300 u AK ukazuju na značaj koekspresije HMGA2 i p300 u ranoj kancerogenezi u epidermisu.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U doktorskoj disertaciji je učinjena iscrpna i pregledna komparacija dobijenih rezultata sa relevantnim literaturnim podacima drugih autora koji se bave proučavanjem poremećaja opisanih proteina i ulogom u kancerogenezi. Većina dosadašnjih istraživanja je bila sprovedena na SCC i njihovim prekursorima na drugim lokalizacijama, osim u slučaju proteina p300, kada su ispitivani samo invazivni SCC kože, ali ne i in situ lezije (Chen i saradnici, 2014).

Prisustvo ekspresije HMGA1a/1b je u ovom istraživanju bilo češće u invazivnom SCC kože nego u in situ lezijama. Ranije je pokazana viša ekspresija ovog proteina u invazivnom SCC grlića materice u poređenju sa različitim stepenom cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN), kao primera displazije u slojevitim epitelima (Bandiera i saradnici, 1998). Iako je u CIN lezijama pokazano povećanje ekspresije HMGA1a/1b sa progresijom displazije, u ovom istraživanju to nije uočeno u CIN lezijama. Kao moguć mehanizam nastanka povišene ekspresije HMGA1a/1b u SCC kože naveden je poremećaj Wnt/ β -katenin signalnog puta, koji je često poremećen u opisanim tumorima (Brasanac i saradnici, 2005). Iako je ekspresija HMGA1a/1b u invazivnim SCC kože bila češća, uočen je paradoksalan nalaz smanjenja ekspresije sa dediferencijacijom tumora, kakav u literaturi, do sada, nije opisan.

U ovom istraživanju je uočena povišena ekspresija HMGA2 u invazivnom SCC u poređenju sa in situ lezijama. Ranija istraživanja na tumorima kože su vršena u melanomima, u kojima je ekspresija ovog proteina bila povišena u poređenju sa benignim nevusima (Raskin i saradnici, 2013). Ovo istraživanje je pokazalo i varijabilnu ekspresiju HMGA2 u in situ lezijama u pogledu obima i distribucije. Difuzna, ali i ekspresija HMGA2 varijabilnog obima je uočena u displazijama nastalim na terenu skvamozne metaplazije bronha (Sarhadi i saradnici, 2006). U skladu sa literaturnim podacima o ekspresiji HMGA2 u SCC usne duplje je i prikazano odsustvo razlika u ekspresiji ovog proteina u odnosu na prognostičke parametre SCC kože (diferentovanost i dijametar) (Sterenczak i saradnici, 2014).

U ovom istraživanju je pokazan porast ekspresije PRMT1 u invazivnom SCC kože u poređenju sa in situ lezijama, ali i paradoksalno smanjenje ekspresije u slabo diferentovanim tumorima u poređenju sa bolje diferentovanim. Slično, nešto niža ekspresija PRMT6 je uočena u invazivnom SCC kože u poređenju sa in situ lezijama, kao i neočekivano povećanje ekspresije u

slabo diferentovanim tumorima u poređenju sa bolje diferentovanim. Ovakve varijacije ekspresije PRMT1 i PRMT6 nisu opisane u literaturi. Kao objašnjenje njihovog značaja ponuđena je mogućnost interakcije ovih proteina sa E-kaderinom i MMP9. Njihova interakcija je ranije opisana u drugim tumorima (Avasarala i saradnici, 2015; Cha i saradnici, 2011; Kim i saradnici, 2013) ali upotrebom imunohistohemijskih metoda u ovom istraživanju nije pokazana njihova korelacija.

Povišena ekspresija p300, koja je u ovom istraživanju uočena u invazivnom SCC kože u poređenju sa in situ lezijama, je nalaz koji je suprotan nalazu u melanomima i displastičnim melanocitnim nevusima (Rotte i saradnici, 2013). U ovom istraživanju su potvrđeni nalazi Chena i saradnika da obim ekspresije p300 ne korelira sa dijametrom, debljinom i stepenom diferentovanosti SCC kože, ali je uočeno da je difuzna distribucija imunopozitivnosti u tumorskim plažama udružena sa većom debljinom tumora i njihovom dubljom invazijom. Gubitak jedarne ekspresije, kakav je u ovom istraživanju uočen u SCC kože, ranije je pokazan i u drugim malignim tumorima (Ying i saradnici, 2010). Međutim, za razliku od SCC kože, taj gubitak je korelirao sa dijametrom tumora, njegovom diferentovanošću i dubinom invazije. Pojava citoplazmatske ekspresije PCAF u većini ispitanih slučajeva kakva je uočena u ovom istraživanju, ranije nije opisana i uglavnom je postojao i njen gubitak, nastao kao posledica metilacije promotorskog regiona gena (Zhu i saradnici, 2009).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Bosic M, Brasanac DC, Stojkovic-Filipovic JM, Zaletel IV, MD, Gardner JM, Cirovic SL. Expression of p300 and p300/CBP associated factor (PCAF) in actinic keratosis and squamous cell carcinoma of the skin. Exp Mol Pathol 2016; 100:378-385. M21, IF 2,706

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija dr Martine Bosić, pod nazivom „**Ekspresija proteina visoke mobilnosti grupe a (HMGA) i njihovih modulatora u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože**” predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju progresije preinvazivnih lezija keratinocita kao i sticanja karakteristika invazivnog planocelularnog karcinoma povezanih sa potencijalno agresivnijim biološkim ponašanjem

Komisija zaključuje da je istraživanje sprovedeno u skladu sa najvišim standardima naučno-istraživačkog rada. Disertacija je napisana jasno, ciljevi su precizno definisani, rezultati pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, uz odgovarajuće tabelarne i prikaze u slikama, 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 Martine Bosić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 25.05. 2016.

Članovi Komisije:

Prof. dr Jasmina Marković-Lipkovski

Doc. dr Milica Labudović-Borović

Doc. dr Slaviša Đuričić

Mentor:

Prof. dr Dimitrije Brašanac
