

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća od 28. aprila 2016. godine određena je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije kandidata mr sci med dr Jelene Stojković-Filipović, pod nazivom **„Ekspresija proteina održavanja minihromozoma u keratinicitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože“**. Mentor doktorske disertacije je prof. dr Dimitrije Brašanac, redovni profesor patologije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, komentor profesor dr Ljiljana Medenica, redovni profesor dermatovenerologije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu.

Za članove Komisije za ocenu završene doktorske disertacije određeni su:

1. **Prof. dr Miloš Nikolić**, redovni profesor dermatovenerologije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. **Doc. dr Nada Tomanović**, patolog, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. **Doc. dr Danica Todorović**, dermatovenerolog, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Članovi Komisije su detaljno proučili priloženu disertaciju i podnose Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A) PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dr Jelene Stojković-Filipović, **„Ekspresija proteina održavanja minihromozoma u keratinicitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože“** napisana je na 205 strane, sadrži 11 grafikona i 77 tabela. Doktorska disertacija je podeljena na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci, Literatura i Prilozi. Na početku rada nalazi se sažetak teze na srpskom i engleskom jeziku, kao i lista ključnih reči.

Uvod (60 stranica) sadrži 34 potpoglavlja koja su napisana jasno i detaljno. Prikazana je definicija, etiologija, patogeneza, učestalost, uzrast i pol, lokalizacija, klinička slika, histološka slika i terapija aktinične keratoze (AK), Bowen-ove bolesti (BD) i planocelularnog karcinoma kože (SCC), kao i KIN klasifikacija preinvazivnih lezija. Pored toga opisan je ćelijski ciklus u svojoj osnovi, a opširnije proteini održavanja minihromozoma (MCM proteini), njihove osnovne karakteristike i uloga odnosu na ćelijski ciklus i kancerogenezu generalno, kao i konkretno kod planocelularnog karcinoma.

U okviru **Ciljevi rada** (2 stranica) predstavljeni su sledeći ciljevi: 1) ispitivanje ekspresije MCM 2, 5 i 7 u aktiničnoj keratozi, Bowen-ovoj bolesti i invazivnom planocelularnom karcinomu kože; 2) analiza ispoljavanja MCM 2, 5 i 7 u in situ lezijama klasifikovanim kao keratinocitna intraepidermalna neoplazija (KIN); 3) poređenje ekspresije MCM 2, 5 i 7 i prognostičkih parametara planocelularnog karcinoma kože – dimenzije, debljina i gradus tumora; 4) procena različitih načina evaluacije imunohistohemijskog bojenja i ekspresije MCM proteina u odnosu na tip lezije i prognostičke parametre.

Materijal i metode (10 stranica) sadrži dva osnovna dela – materijal u kome su detaljno opisane kliničke (pol i uzrast pacijenata, lokalizacija i dimenzije lezija) i histopatološke karakteristike uzorka koji su ispitivani, i metode u kojima su objašnjene osnove metodologije (formiranje tkivnog mikroniza), imunohistohemijski protokol (priprema uzoraka, deparafinizacija, blokiranje endogene peroksidaze, antigensko demaskiranje, primarna antitela, vizuelizacioni sistem, dehidratacija isečaka, kontrolni uzorci), i evaluacija imunohistohemijskog bojenja. Ispitivanje je sprovedeno kao retrospektivna studija u kojoj su korišćeni parafinski kalupi Instituta za patologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu. Iz ranije specijalno osmišljene i formirane (popunjene) baze podataka o biopsijama kože odabrani su od 2012. godine unazad, slučajevi AK, BD i SCC do popunjavanja po 50 slučajeva KIN1, KIN2 i KIN3 preinvazivnih lezija, kao i po 50 slučajeva dobro, srednje i slabo diferentovanog SCC. Inicijalno je odabrano 360 slučajeva, ali je nakon imunohistohemijskog bojenja, iz tehničkih razloga došlo do gubitka određenog broja uzoraka tako da je broj, adekvatan za evaluaciju i tumačenje rezultata, konačno bio 315. Od ukupnog broja bilo je 91 AK, 50 BD i 174 SCC, po 58 dobro (G1), srednje (G2) i slabo (G3) diferentovanih SCC. Prema KIN klasifikaciji od 141 preinvazivne lezije bilo je 50 KIN1, 40 KIN2 i 51 KIN3. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Za sve imunohistohemijske markere (MCM2, MCM5 i MCM7) vršena je analiza distribucije pozitivnih ćelija kao bazalne, suprabazalne i difuzne kod in situ lezija (AK, BD i KIN), odnosno periferne, centralne i difuzne kod SCC. Distribucija je potom poređena sa histopatološkim tipom lezije - AK, BD i SCC, i KIN tipom, parametrima koji ukazuju na veću agresivnost SCC - stepen diferentovanosti, maksimalna dimenzija i maksimalna debljina, kao i sa površinom lezija (KIN i SCC). Isti tipovi poređenja vršeni su i kod obima ekspresije pri čemu su slučajevi grupisani u one sa do 50% pozitivnih ćelija (0/+ /++) i preko 50% pozitivnih ćelija (+++/++++), kao i do 33% (0/+), između 33-66% (++) i preko 66% pozitivnih ćelija (+++). Obim ekspresije, tj. broj pozitivnih ćelija svakog od navedenih merкера određivan je semikvantitativno za sve slučajeve, posebno, prema navedenim obimima (grupisanje pozitivnih ćelija). Za jedan broj slučajeva, broj pozitivnih ćelija određivan je manualnim i automatskim brojanjem, a potom su tako dobijeni rezultati upoređivani. Takođe, za iste slučajeve, rezultati dobijeni manualnim brojanjem upoređeni su sa semikvantitativno procenjenim obimom ekspresije koji je korišćen za definitivnu analizu rezultata

Za statističku analizu rezultata korišćen je softverski paket SPSS (engl. Statistical Package for Social Sciences) za Windows, verzija 20.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). U ovom radu su korišćene metode deskriptivne i inferencijalne statistike. Od metoda **deskriptivne statistike** korišćene su: mere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana), mere varijabiliteta (interval varijacije - opseg, standardna devijacija - SD) i relativni brojevi (frekvence). Vrednosti kontinuiranih varijabli prikazane su kao prosečna vrednost $\pm$ SD, a diskontinuiranih varijabli kao brojevi i procenti. Distribucija vrednosti (provera numeričkih vrednosti, tj. procena normalnosti raspodele) proveravana je upotrebom Shapiro-Wilk testa. Od metoda **analitičke statistike** korišćeni su neparametarski testovi za nezavisne uzorke: χ^2 test, Kruskal-Wallis i Mann-Withey test. Za procenu rasporeda (distribucije) i broja (obima) MCM pozitivnih ćelija u odnosu na histopatološku dijagnozu, stepen diferentovanosti (gradus) tumora, dijametar (granica 20mm) i debljinu tumora (granice 2mm, 4 mm i 6 mm) korišćen je χ^2 test. Za procenu rasporeda (distribucije) i broja (obima) MCM pozitivnih ćelija u odnosu na površinu tumora korišćen je Kruskal-Wallis test, a za međugrupno poređenje Mann-Withey test. Podaci su prikazani tekstualno, tabelarno i grafički. Vrednosti verovatnoće (P) manje od 0.05 smatrane su statistički značajnim.

Rezultati (63 stranica) prikazuju sve nalaze dobijene ovim istraživanjem kroz 11 grafikona i 73 tabele, uz potrebna objašnjenja u pratećem tekstu. Rezultati su prikazani u tri

dela, svaki deo za poseban MCM protein, koji je dalje dodatno podeljen na tri dela, distribuciju i obim ekspresije semikvantitativno do i preko 50% pozitivnih ćelija i semikvantitativno manje od 33%, od 33-66% i preko 66% pozitivnih ćelija.

U poglavlju **Diskusija** (44 stranica) detaljno su analizirani dobijeni rezultati istraživanja, redosledom kojim su prikazani u prethodnom poglavlju. Svi rezultati istraživanja su poređeni sa podacima iz literature, uz tumačenje uočenih sličnosti i razlika.

Zaključak (3 stranice) je predstavljen u formi jasno definisanih konstatacija koje sledeju iz tumačenja dobijenih rezultata, redosledom koji odgovara postavljenim ciljevima.

Literatura (23 stranica) sadrži 204 bibliografskih jedinica iz referentnih međunarodnih i domaćih časopisa, udžbenika, pretežno novijeg datuma.

Prilozi (9 stranica) sadrži spisak skraćenica, biografiju kao i izjave o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorata i korišćenju.

B) OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U ovoj studiji je ustanovljeno da je ekspresija MCM2, MCM5 i MCM7 bila značajno različita kod svakog od pojedinačnih, ispitivanih histopatoloških entiteta. U analizi distribucije pozitivnih ćelija bazalna distribucija bila je dominantna kod AK, difuzna kod BD, dok su periferna i difuzna distribucija bile gotovo podjednako zastupljene kod SCC. U slučaju *in situ* lezija, klasifikovanih kao KIN, difuzna distribucija bila je uočena češće kod KIN3 u odnosu na KIN1, KIN2 ili KIN1 i KIN2 zajedno. U slučaju SCC, MCM2, MCM5 i MCM7 su pokazali dominantno perifernu distribuciju u najvećem broju slučajeva dobro diferentovanih SCC (G1). U slučaju srednje diferentovanih SCC (G2) periferna i difuzna distribucija sva tri proteina bile su uočene u gotovo podjednakom broju slučajeva, dok je kod najvećeg broja slabo diferentovanih SCC (G3) dominirala difuzna distribucija pozitivnih ćelija. Analizom distribucije MCM2, MCM5 i MCM7 u odnosu na prognostičke parametre SCC, iako je kod većih i debljih tumora difuzna distribucija bila dominantna, značajna razlika uočena je samo u slučaju kada je granica debljine tumora iznosila 6 mm. Analizom distribucije u odnosu na površinu SCC uočeno je da su tumori veće površine imali difuznu distribuciju pozitivnih ćelija sva tri MCM proteina. Kod KIN, sa porastom površine lezije distribucija se menjala od bazalne ka difuznoj i razlika je bila statistički značajna za svaki od pomenutih proteina. Semikvantitativnom procenom broja pozitivnih ćelija, sa granicom 50%

utvrđena je razlika u obimu ekspresije u odnosu na histopatološki tip lezije. Procenat pozitivnih MCM2, MCM5 i MCM7 ćelija rastao je od AK, BD do SCC, ali je razlika u broju pozitivnih ćelija bila je značajna samo za MCM2 i MCM5. U slučaju MCM7, utvrđena je značajna razlika u ekspresiji između AK i SCC. I kod KIN lezija procenat pozitivnih ćelija rastao je od KIN1 do KIN3. Obim ekspresije MCM2, MCM5 i MCM7 bio je različit između KIN3, KIN1 i KIN2, kao i kada su KIN1 i KIN2 činile jednu grupu. Razlika u ekspresiji MCM2 i MCM5 bila je manja između KIN1 i KIN2, a u slučaju MCM7 i nije imala statističku značajnost. Ekspresija sva tri proteina takođe se razlikovala kod SCC različitog stepena diferentovanosti. Procenat MCM2, MCM5 i MCM7 pozitivnih ćelija povećavao se od dobro ka slabo diferentovanim tumorima i bio značajno različit između tumora različitih gradusa, SCC G1, SCC G2 i SCC G3. Pojedinačnim poređenjem, razlika u ekspresiji bila nešto manje izražena između SCC G2 i G3. Kada je analiziran obim ekspresije MCM2, MCM5 i MCM7 pozitivnih ćelija, sa granicom 50%, u odnosu na prognostičke parametre SCC, utvrđena je razlika u ekspresiji sva tri proteina samo u odnosu na debljinu tumora, kada je granica debljine iznosila 6 mm. Ekspresija se nije značajno razlikovala kod SCC različite veličine. Analizom ovog obima ekspresije kod SCC različite površine, uočeno je da tumori veće površine imaju veći broj pozitivnih ćelija, ali razlika u ekspresiji nije bila značajna. Kod lezija klasifikovanih kao KIN broj pozitivnih ćelija rastao je sa povećanjem površine lezija i razlika je bila statistički značajna.

C) UPOREDNA ANALIZA DOBIJENIH NALAZA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

Rezultati istraživanja su sistematično, redosledom kojim su prikazani, upoređivani sa rezultatima drugih autora u poglavlju diskusija.

Ovo je prva studija u kojoj je procenjivana distribucija i ekspresija više različitih MCM proteina u i preinvazivnim i invazivnim keratinocitnim neoplazmama kože. Prema rezultatima ove studije difuzna distribucija i veći obim ekspresije MCM2, MCM5 i MCM7 proteina ćelijskog ciklusa u BD u odnosu na AK, KIN3 u odnosu na KIN1 i KIN2, kao i kod slabo diferentovanih SCC u odnosu na dobro diferentovane SCC ukazuje na njihovu ulogu u progresiji *in situ* i invazivnih keratinocitnih neoplazmi. Sličan tip distribucije MCM5 proteina je prikazan od strane Liu i saradnika u BD i SCC, ali bez analize AK i druga dva MCM proteina. U radu Abdou i saradnika MCM2 ekspresija u SCC je bila dominantno

periferna, ali manje od 10% slučajeva u njihovoj studiji je bilo slabo diferentovano, za razliku od uravnoteženog broja SCC različitog stepena diferentovanosti u ovoj doktorkoj disertaciji. U dosadašnjoj literaturi nije bilo prikaza distribucije MCM proteina u odnosu na KIN klasifikaciju, ali studija u vulvarnoj intraepitelnoj neoplaziji (VIN) je pokazala sličan porast broja slučajeva s difuznom ekspresijom sa porastom VIN gradusa (Davidson et al 2003). Analiza obima (procenta) pozitivnih ćelija u dve prethodne studije dala je slične rezultate kao u ovoj doktorskoj tezi, sa porastom ekspresije u BD u odnosu na AK i u slabo diferentovanim SCC u odnosu na dobro diferentovane tumore, uz napomenu da su u obe studije rađene na samo po jednom MCM proteinu, i to MCM2 (Abdou i saradnici 2014) i MCM5 (Liu i saradnici 2009), dok MCM7 nije ispitivan. Jedna ranije publikovana studija (Shin i saradnici 2010) ispitivala je obim MCM ekspresije (i to isključivo MCM2 proteina) u odnosu na KIN klasifikaciju, a rezultati su uporedivi sa dobijenim u ovoj doktorskoj tezi, iako uz korišćenje nešto drugačijeg načina evaluacije obima pozitivnosti.

Utvrđena korelacija sa debljinom tumora 6mm, kao prognostičkim parametrom SCC, što je debljina SCC koja je nedavno u literaturi definisana kao ona preko koje SCC imaju značajno veću učestalost recidiva i metastaza, ukazuje na zaključak da je ekspresija MCM2, MCM5 i MCM7 proteina udružena sa značajnim faktorima rizika SCC. Ova povezanost je utvrđena kako za difuznu distribuciju, tako i za obim ekspresije preko 50%. Takođe, činjenica da su slični rezultati dobijeni u slučaju svakog od proteina pojedinačno govori u prilog mogućnosti njihovog korišćenja kao prognostičkih indikatora invazivnijih tumora sa većim rizikom za pojavu recidiva i metastasko širenje. Do sada nije bilo publikovanih studija koje bi poredile distribuciju i/ili obim MCM ekspresije u odnosu na debljinu SCC, ali je slična povezanost obima MCM7 ekspresije i debljine tumora (kao najvažnijeg prognostičkog parametra) utvrđena u melanoma kože.

D) OBJAVLJENI ILI SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO TEZE

Rad u časopisu indeksiranom u Current Contents-u (CC) i Science Citation Index-u (SCI):

Stojkovic-Filpovic J, Brasanac D, Bosic M, Boricic N, Lekic B. Expression of minichromosome maintenance proteins in actinic keratosis and squamous cell carcinoma. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, In press 2016; **M22, IF 2.012**

E) ZAKLJUČAK

Doktorska disertacija pod nazivom „**Ekspresija proteina održavanja minihromozoma u keratinicitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože**“ kandidata mr sci med dr Jelene Stojković-Filipović je aktuelna, značajna i predstavlja originalan naučni doprinos u istraživanjima koja se odnose na potencijalne nove biomarkere za keratinocitne neoplazme kože i stepen aktivnosti ove vrste neoplazmi.

Na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da imunohistohemijska detekcija prisustva, distribucije i obima ekspresije MCM 2, 5 i 7 može biti od pomoći u analizi progresije preinvazivnih keratinocitnih lezija kože kao i u, određivanju stepena malignog potencijala i dalje biološke aktivnosti invazivnog planocelularnog karcinoma kože.

Na osnovu navedenih podataka, Komisija smatra da doktorska disertacija predstavlja originalni naučni doprinos i predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati disertaciju mr sci med dr Jelene Stojković-Filipović pod naslovom „**Ekspresija proteina održavanja minihromozoma u keratinicitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože**“ i odobri njenu javnu odbranu.

Beograd, 25. maj 2016. godine

Članovi komisije:

Mentor: Prof. dr Dimitrije Brašanac

Prof. dr Miloš Nikolić

Komentor: Prof. Dr Ljiljana Medenica

Doc. dr Nada Tomanović

Doc. dr Danica Todorović