

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16-AS, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Prognostički značaj molekularnih markera, kliničkih i patohistoloških parametara kod bolesnika operisanih zbog karcinoma rektuma u ranom stadijumu“

kandidata dr Aleksandra Sekulića, zaposlenog na Klinici za digestivnu hirurgiju-Prva hirurška klinika, Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentor je Prof.dr Zoran Krivokapić, komentor Prof. dr Svetislav Tatić

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Velimir Marković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Goran Barišić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof.dr Vesna Dragutinović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. Prof. dr Slavica Knežević-Ušaj, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu
5. Doc.dr Nebojša Manojlović, docent Medicinskog fakulteta VMA

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 Aleksandra Sekulića napisana je na ukupno 165 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 21 tabela, 49 grafikona i 9 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je detaljno opisana epidemiologija, etiologija, dijagnostika kao i metode lečenja karcinoma rektuma. Ukazano je koliko ovo oboljenje i danas predstavlja veliki javnozdravstveni problem kod nas i u svetu. Poseban akcenat stavljen je na bolesnike sa karcinomom rektuma u IIA stadijumu bolesti odnosno dileme koje postoje u izboru metoda lečenja ovih bolesnika. Na adekvatan način je u potpunosti opisano hirurško lečenje, neoadjuvantna i adjuvantna terapija. Posebno je ukazano na značaj multidisciplinarnog

pristupa u lečenju ovih bolesnika koji je danas uslov za postizanje dobrih rezultata. Odvojeno je obrađena i tematika recidiva bolesti, kako lokalnog recidiva tako i distalnih metastaza. Opisani su potencijalni faktori rizika za pojavu recidiva bolesti.

Takođe su prikazna dosadašnja saznanja vezana za molekularne markere i njihov prognostički značaj kod bolesnika sa karcinomom rektuma. Ukazano je na njihov značaj koji mogu imati kod bolesnika u ranom stadijumu bolesti, IIA stadijumu, odnosno selekciji bolesnika sa lošom prognozom koji zahtevaju agresivnije terapijske režime.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od utvrđivanja značaja nivoa ekspresije molekularnih markera (EGFR, VEGF, CD44v6) u prognozi toka bolesti (pojavi lokalnog i udaljenog recidiva bolesti, preživljavanje bolesnika) kod bolesnika radikalno operisanih zbog T3N0M0 karcinoma rektuma. Takođe kao cilj rada navedeno je i utvrđivanje korelacije između kliničkih i patohistoloških parametara sa intenzitetom ekspresije molekularnih markera (EGFR, VEGF, CD44v6).

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je sprovedena na Klinici za digestivnu hirurgiju-Prvoj hirurškoj klinici, Kliničkog centra Srbije i Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Detaljno su opisani kriterijumi za uključanje u studiju kao i kriterijumi za isključenje iz studije. Svi bolesnici bili su sa T3N0M0 stadijumom bolesti, potvrđenim definitivnom patohistološkom analizom resekiranih preparata. Ni kod jednog bolesnika nije primenjena neoadjuvantna terapija. Detaljno je opisano imunohistohemijsko ispitivanje kojim su testirani potencijano najznačajniji molekularni markeri prognoze, a posebno značajni i danas aktuelni receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR), tkivni faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) i CD44v6. Imunohistohemijsko ispitivanje sprovedeno je konstrukcijom tkivnog mikroniza (*Tissue microarray-TMA*). Bolesnici su nakon operacije kontrolisani po utvrđenoj shemi praćenja (follow-up), koja je zavisila od procenjenog rizika za nastanak recidiva bolesti. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

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.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena literatura sadrži spisak od 233 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Osnovni uzorak čini 163 bolesnika. Period praćenja bolesnika (Follow-up) se kretao u intervalu od 4 do 177 meseci, srednja vrednost 81 mesec. Lokalni recidiv dijagnostikovao je kod 6 bolesnika a distalne metastaze kod 31 bolesnika. Kumulativni petogodišnji lokalni recidiv iznosio je 4% a kumulativni petogodišnji procenat distalnih metastaza bio je 20%.

Postoji statistički značajna razlika između grupa sa i bez lokalnog recidiva u odnosu na udaljenost tumora od anokutane linije ($p=0.005$). Kod tumora distalne trećine rektuma, češća je pojava lokalnog recidiva u odnosu na srednju i proksimalnu trećinu. Perforacija tumora značajno utiče na pojavu lokalnog recidiva, odnosno lokalni recidiv se češće javlja kod pacijenata kod kojih je intraoperativno došlo do perforacije tumora. (Fisher test $p=0.007$). Takođe je potvrđena statistički značajna razlika između perineuralne infiltracije i pojave lokalnog recidiva. Lokalni recidiv je češće dijagnostikovao kod mucinoznih tipova adenokarcinoma u odnosu na karcinome gde nije bila prisutna mucinozna komponenta (Fisher test $p=0.001$). Utvrđena je statistički značajna razlika između T stadijuma i pojave lokalnog recidiva (Fisher's test $p=0,024$). U grupi T3a,b stadijuma lokalni recidiv dijagnostikovao je kod jednog bolesnika dok je grupi T3c,d tumora bio dijagnostikovao kod pet bolesnika od ukupno šest sa lokalnim recidivom.

Univarijantnom cox regresionom analizom ispitivani su kliničkopatološki parametri u odnosu na pojavu distalnih metastaza. Metastaze su češće dijagnostikovane kod mucinoznih adenokarcinoma, ulceroinfiltrativnih tumora, kada postoji invazija limfatika i vaskularna invazija, kod loše diferentovanih tumora kao i povišene VEGF, EGFR i CD44v6 imunoekspresije.

Od ukupno 163 bolesnika pozitivna VEGF imunoekspresija registrovana je kod 90 (55,2%) bolesnika, pozitivna EGFR imunoekspresija kod 102 (62,6%) a pozitivna CD44v6 imunoekspresija kod 99 (60,7%) bolesnika. Postoji statistički značajna razlika VEGF imunoekspresije u odnosu na gradus tumora (G) i postojanje vaskularne invazije. Kod dobro diferentovanih tumora pozitivna VEGF imunoekspresija iznosila je 51.8%, kod umereno diferentovanih 75%, dok je kod loše diferentovanih tumora registrovana u 66,7% slučajeva.

Pozitivna VEGF ekspresija je češća kada postoji vaskularna invazija tumora. Kod postojanja vaskularne invazije VEGF pozitivna ekspresija je 75% dok u slučajevima gde ne postoji vaskularna invazija iznosi 25%.

Takođe, potvrđena je statistički značajna razlika između EGFR imunoekspresije i postojanja vaskularne unvazije.

Petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival-DFS) za celu ispitivanu grupu iznosilo je 77%. Preživljavanje bez znakova bolesti u odnosu na kliničkopatološke varijable testirano je Kaplan-Meierovom analizom a značajnost razlike na nivou petogodišnjeg preživljavanja utvrđena je Log Rank testom.

Petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti kod VEGF (+) bolesnika bilo je 65% a kod VEGF (-) 90%. Postoji statistički značajan razlika u preživljavanju bez znakova bolesti između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test p=0.001*). Petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti kod EGFR (+) bolesnika bilo je 85% a kod EGFR (-) 72%. Iako postoji trend lošijeg preživljavanja bez znakova bolesti kod EGRF (+) ispitanika, statistička značajnost nije dostignura (*Log Rank test p 0.111*). Petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti kod CD44v6(+) bolesnika bilo je 69% a kod CD44v6 (-) 89. Postoji statistički značajan razlika u preživljavanju bez znakova bolesti između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test p 0.004*)

Petogodišnje kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival-DSS) za ispitivanu grupu iznosilo je 84%. Petogodišnje kancer specifično preživljavanje kod VEGF (+) bolesnika bilo je 77% a kod VEGF (-) 93%. Postoji statistički značajan razlika u petogodišnjem DSS između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test p = 0.002*). Petogodišnje kancer specifično preživljavanje u grupi EGFR (+) bolesnika bilo je 82% a grupi EGFR (-) bolesnika 89%. Nije potvrđena statistička značajnost razlike između ove dve grupe bolesnika (*Log Rank test p 0.352*). Petogodišnje kancer specifično preživljavanje kod CD44v6(+) bolesnika bilo je 79% a kod CD44v6 (-) bolesnika 91%. Postoji statistički značajan razlika u petogodišnjem DSS između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test p= 0.037*)

Petogodišnje sveukupno preživljavanje bolesnika (Overall survival-OS) za ispitivanu grupu bolesnika iznosilo je 69%. Petogodišnje sveukupno preživljavanje bolesnika kod VEGF (+) bolesnika bilo je 59% a kod VEGF (-) bolesnika 80 %. Postoji statistički značajan razlika u petogodišnjem sveukupnom preživljavanju između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test p = 0.001*). Petogodišnje sveukupno preživljavanje u grupi EGFR (+) bolesnika bilo je 67% a

grupi EGFR (-) bolesnika 73%. Nije potvrđena statistička značajnost razlike između ove dve grupe bolesnika (*Log Rank test* $p = 0.306$). Petogodišnje sveukupno preživljavanje kod CD44v6(+) bolesnika bilo je 61% a kod CD44v6 (-) bolesnika 82%. Postoji statistički značajan razlika u petogodišnjem sveukupnom preživljavanju između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test* $p = 0.006$).

Univarijantnim Cox regresionim modelom potvrđeno je da je sveukupno preživljavanje bolesnika lošije ukoliko postoji intraoperativna perforacija tumora, invazija limfatika, perineuralna infiltracija, kod lošije diferentovanih tumora kao i kod povišene VEGF i CD44v6 imunoekspresije. Takođe, sveukupno preživljavanje je lošije i kod prisustva vaskularne invazije obzirom da je p jako blizu dostizanja granične vrednosti ststističke značajnosti ($p=0.051$)

Sve varijable koje su pokazale statističku značajnost u univarijantnoj analizi terstirane su multivarijantnom Cox regresionom analizom. Multivarijantnom analizom su intraoperativna perforacija tumora, infiltracija limfatika, loša diferencijacija tumora kao i kod povišena VEGF i CD44v6 imunoekspresija potvrđene kao nezavisi parametri lošeg sveukupnog preživljavanja bolesnika.

C) Uperedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Biologija karcinoma rektuma se na određeni način razlikuje od karcinoma kolona tako da je i njegov tretman specifičan. Pored potrebe za preciznom preoperativnom dijagnostikom, postoje određene dileme o optimalnoj strategiji lečenja u odnosu na stadijum bolesti. Hirurško lečenje je i dalje osnovni metod u lečenju karcinoma rektuma mada je primena neoadjuvantne terapije pokazala značajne rezultate naročito u lečenju lokalno uznapredovalih tumora. Za razliku od uznapredovalih tumora, gde postoji određeni konsenzus o strategiji lečenja, i dalje postoji problem kada je reč o karcinomima u ranijem stadijumu, posebno stadijumu IIA bolesti.

U novije vreme, postoji tendencija da se u ovoj grupi pacijenata, T3N0 stadijuma, koji na osnovu do sada poznatih kliničkih i patohistoloških faktor rizika ne pripadaju rizičnoj grupi, a kod kojih se recidiv javlja u oko 20% bolesnika, uvođenjem biomarkera i njihovom kombinacijom sa već dobro poznatim faktorima rizika identifikuje podgrupa pacijenata sa visokim rizikom koja bi mogla imati koristi od adjuvantne hemioterapije.

Kod naših bolesnika preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) bilo je 77%, kancer specifično preživljavanje (DSS) 84% dok je sveukupno preživljavanje (OS) iznosilo 69%, što je u korelaciji sa do sada objavljenim studijama za ovaj stadijum bolesti (Huang i sar.,2016).

Pozitivna VEGF imunoekspresija registrovana je kod 55,2% naših ispitanika. Povišena VEGF imunoekspresija je statistički značajno veća kod bolesnika kod kojih postoji vaskularna invazija. Takođe povišena imunoekspresija se češće javlja kod umereno i loše diferentovanih tumora u odnosu na dobro diferentovane tumore. Ovi podaci potvrđuju pretpostavku da je VEGF imunoekspresija karakteristika agresivnijih tumora, znajući da su postojanje vaskularne invazije i gradus tumora faktori loše prognoze. Kod bolesnika sa pozitivnom VEGF imunoekspresijom dokazano je statistički značajno kraće DFS (65%), DSS (77%) kao i OS (59%) u odnosu na bolesnike kod kojih je VEGF imunoekspresija bila negativna. Kod ovih bolesnika je DFS bilo 90%, DSS 93% a OS 80%. Multivarijantnom analizom VEGF je potvrđen kao nezavisan prognostički marker ispitujući OS kao nezavisnu varijablu.

U studiji Kyriakosa i saradnika(Kyriakos i sar.,2008) pokazano je da VEGF ekspresija može biti nezavistan prognostički marker kod kolorektalnog karcinoma u stadijumu II bolesti i naznačena je njegova uloga u selekciji bolesnika sa lošijom prognozom odnosno kandidatima za adjuvantnu hemioterapiju. Grupa pacijenata sa stadijumom II bolesti i visokom imunoekspresijom VEGF-a imala je značajno manje petogodišnje preživljavanje bez bolesti (62.5%) u odnosu na bolesnike sa niskom imunoekspresijom gde je ovo preživljavanje iznosilo 87.5%. Dve retrospektivne studije su takođe pokazale da se VEGF ekspresija može koristiti kao prognostički marker u identifikaciji pacijenata sa nepovoljnom prognozom u stadijumom II bolesti (Cascinu i sar.,2000; Takahashi i sar.,1997).

Sa druge strane postoje studije koje nisu potvrdile prognostički značaj povišene ekspresije VEGF-a u ranim stadijumima kolorektalnog karcinoma. Njegova uloga se uglavnom vezuje za uznapredovalu bolest, u korelaciji je sa višim N statusom i metastatskom bolešću (Des Guetz i sar.,2006; Wang i sar.,2014).

Mnoga istraživanja su sprovedena da bi se ispitaio uticaj CD44v6 na prognozu bolesnika sa kolorektalnim karcinomom (Wang i sar., 2017; Peng i sar.,2007; Saito i sar.,2013; Wang i sar.,2015). Većina ovih studija pokazuje da je povišena ekspresija CD44v6 povezana sa metastaziranjem i lošijim ukupnim preživljavanjem ovih pacijenata(Peng i sar.,2007; Saito i sar.,2013). Saito i sar (Saito i sar.,2013) navode da povišena ekspresija CD44v6 utiče na

DFS i OS kod pacijenata u II stadijumu kolorektalnog karcinoma. Druga studija rađena na 259 ispitanika takođe potvrđuje povišenu ekspresiju CD44v6 kao nezavisnog faktora prognoze, DFS i OS je niži kod povišene ekspresije (Peng i sar.,2007).

Naši rezultati su u saglasnosti sa navedenim studijama. Pozitivna CD44v6 imunoekspresija registrovana je kod 60.7% bolesnika. Kod bolesnika sa povišenom CD44v6 imunoekspresijom DFS, DSS i OS je bilo niže (69%, 79% i 61%) u odnosu na bolesnike sa negativnom CD44v6 imunoekspresijom (89%, 91% i 82%). CD44v6 je multivarijantnom analizom potvrđen kao nezavistan faktor prognoze za OS.

Prognostički značaj EGFR ekspresije kod kolorektalnog karcinoma je može se reći umeren. Podaci koji se odnose na preživljavanje su vrlo ograničeni a pored toga populacija u objavljenim studijama bila je heterogena, uključujući i rane i kasne stadijume bolesti. Takođe mali broj studija se bavio posebno karcinomom rektuma. U svakom slučaju, određen broj studija je pokazao da je povišena EGFR ekspresija povezana sa diferencijacijom tumora i stadijumom, lošijim preživljavanjem bez znakova bolesti i ukupnim preživljavanjem (De Jong i sar., 1998; Mayer i sar.,1993; Zlobec i sar.,2007).

Nasuprot ovim tvrdnjama u studiji Spana i saradnika (Spano i sar.,2005) pokazano je da preživljavanje nije u korelaciji sa EGFR ekspresijom. U ovoj studiji su posebno analizirani pacijenti sa T3N0M0 stadijumom bolesti i kod njih nije pokazana statistička značajnost povišene EGFR imunoekspresije sa preživljavanjem bez znakova bolesti i ukupnim preživljavanjem. U našem istraživanju povišena EGFR imunoekspresija registrovana je kod 62,6% ispitanika. Povišena EGFR imunoekspresija nije statistički dokazana kao značajan faktor prognoze preživljavanja iako je preživljavanje kod pozitivne EGFR imunoekspresije bilo lošije u odnosu na EGFR negativne ispitanike.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Aleksandar Sekulić, Goran Barišić, Duško Dunderović, Svetislav Tatić, Zoran Krivokapić.
Vascular endothelial growth factor as a potential prognostic factor for T3N0 rectal cancer. Vojnosanitetski pregled, 2018 OnLine-First <https://doi.org/10.2298/VSP180120071S> April (00): 71-71.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Prognostički značaj molekularnih markera, kliničkih i patohistoloških parametara kod bolesnika operisanih zbog karcinoma rektuma u ranom stadijumu “ dr Aleksandra Sekulića, predstavlja originalni naučni doprinos u cilju poboljšanja rezultata lečenja bolesnika sa karcinomom rektuma.

Iako TNM klasifikacija tumora i dalje predstavlja osnov za određivanje stadijuma bolesti i selekciju pacijanata za specifičan modalitet lečenja, može se reći da ona ima određene nedostatke obzirom na činjenicu da pacijenti istog stadijuma bolesti pokazuju varijacije u pogledu krajnjeg ishoda. Ova zapažanja danas opravdavaju potrebu za novim vidovima bojenja i preciznijom analizom reseciranih preparata koja bi nam dala što jasnije informacije u pogledu ishoda bolesti. Naročito velika pažnja posvećuje se tumorima u ranijem stadijumu bolesti gde se nakon hirurškog lečenja zasnovanog na savremenim principima očekuje dobar ishod, pre svega u smislu preživljavanja i niske stope recidiva bolesti. Zbog toga postoji velika potreba za identifikacijom molekularnih markera koji bi ukazali na agresivnost tumora i mogućnost selekcije pacijenata za primenu sistemske adjuvantne ili ciljane terapije. U tom cilju ova studija u kojoj su VEGF i CD44v6 potvrđeni kao potencijalni faktori prognoze kod bolesnika operisanih zbog karcinoma rektuma T3N0M0 stadijuma, daje svoj doprinos kako bi se pacijenti sa lošom prognozom identifikovali i postal kandidati za agrsivnije terapijske režime.

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 Aleksandra Sekulića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 11.06.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Velimir Marković

Prof. dr Goran Barišić

Prof. dr Vesna Dragutinović

Prof. dr Slavica Knežević-Ušaj

Doc. dr Nebojša Manojlović

Mentor:

Prof. dr Zoran Krivokapić

Komentor:

Prof. dr Svetislav Tatić
