

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 15.03.2018. godine, broj 5940/15-DG, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Izvodljivost velikih resekcija jetre kod bolesnika sa hepatocelularnim karcinomom i cirozom jetre primenom radiofrekventne energije“

kandidata Mr sci med dr Danijela Galuna, zaposlenog na Klinici za digestivnu hirurgiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentor je Prof. dr Miroslav Milićević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Rada Ješić Vukičević, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Marinko Žuvela, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. N.Sar dr Sanja Stanković, Centar za medicinsku biohemiju KCS

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 Danijela Galuna napisana je na ukupno 113 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, metod, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 50 tabela, 23 grafikona i 10 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je predstavljen embrionalni razvoj jetre i njena anatomija, dat je prikaz ciroze jetre i njenih komplikacija kao i primena radiofrekventne energije kod resekcija jetre.

Na adekvatan način je u potpunosti opisano multimodalno lečenje bolesnika sa hepatocelularnim karcinomom prema preporukama Barselona Clinic Liver Cancer grupe. Predstavljene su svi danas dostupni modaliteti lečenja: metode termalne ablacije, resekcija i

transplantacija jetre, transarterijska hemoembolizacija, medikamentozna terapija i simptomatsko lečenje. Svi navedeni modaliteti lečenja predstavljeni su prema odgovarajućim stadijumima bolesti.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od: a) ispitivanja izvodljivost velikih resekcija jetre kod bolesnika sa hepatocelularnim karcinomom na terenu cirotično izmenjene jetre određivanjem postoperativnog morbiditeta i mortaliteta; b) određivanja preoperativnih, intraoperativnih i patohistoloških prognostičkih parametara povezanih sa najvećim preživljavanjem; c) ispitivanja postoperativnog oporavka funkcije cirotične jetre primenom statičkih i dinamičkih testova i d) procene regenerativnog potencijala cirotične jetre merenjem nivoa TNF α i IL6 u prvih 48h posle resekcije jetre.

U poglavlju **metode** je navedeno da se radi o kohortnoj studiji koja je sprovedena u periodu od novembra 2001. do novembra 2012. godine na Klinici za digestivnu hirurgiju KCS. U navedenom periodu obrađeno je 116 bolesnika sa hepatocelularnim karcinomom. Detaljno je opisana primenjena hiruška tehnika i prikazana je klasifikacija hirurških komplikacija prema Clavienu. Predstavljen je način određivanja nivoa IL6 i TNF α na proteinskom nivou kao i određivanje genske ekspresije navedenih citokina. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je od strane Etičkog komiteta KCS i 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 204 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Analizom je obuhvaćeno 116 bolesnika sa hepatocelularnim karcinomom kod kojih je primenjena radiofrekventna resekcija jetre u periodu od novembra 2001. do novembra 2012. godine. U navedenom periodu kod 41 bolesnika urađena je velika resekcija. Od toga 20 bolesnika je imalo cirozu jetre a 21 bolesnik je bio bez ciroze. U grupi bolesnika sa cirozom jetre najznačajniji etiološki faktor bila je hronična hepatitis B virusna infekcija a najveći broj bolesnika je imao Child A cirozu. Nije nađena statistični značajna razlika između dve

posmatrane grupe ispitanika u pogledu segmentne lokalizacije tumora, veličine i broja tumora. Takođe, nije nađena statistički značajna razlika između bolesnika sa cirozom i bez ciroze jetre u odnosu na status resekcione margine i težinu preparata kao ni u odnosu na zastupljenost dodatne operacije. Dve grupe ispitanika nisu se razlikovale ni u odnosu na trajanje operacije i resekcije jetre niti u odnosu na dužinu postoperativnog lečenja.

Ukupno prosečno preživljavanje bolesnika iznosilo je 60,00 meseci (51,06-68,94), u grupi bolesnika sa cirozom 57,40 (42,27-72,53), a u grupi bolesnika bez ciroze jetre 62,00 (4,83-52,52) meseci. Razlika između grupa nije statistički značajna. U odnosu na učestalost postoperativnih komplikacija nije nađena značajna razlika između dve grupe ispitanika. U perioperativnom periodu kod 4 bolesnika je data nadoknada krvi, u grupi ciroza kod jednog bolesnika u količini od 127ml a u grupi bez ciroze kod 3 bolesnika sa maksimalnim volumenom od 980ml. Dve ispitivane grupe nisu se razlikovale u odnosu na zahtev za perioperativnom transfuzijom. Jedina razlika između grupa utvrđena je u odnosu na postoperativnu nadoknadu albumina i to u korist bolesnika sa cirozom.

Analizom prognostičkih parametara jedina značajna razlika utvrđena je između bolesnika čija je operacija trajala duže od 300 minuta u odnosu na bolesnike čija je operacija trajala kraće od naznačenog vremena. Time je pokazano da trajanje operacije duže od 300 minuta nepovoljan prognostički faktor. Drugi ispitivani parametri - uzrast bolesnika (grupa starija od 70 godina), resekcija IV segmenta, Child B funkcionalni status jetre, R1 status resekcione margine, primena perioperativne transfuzije nisu bili povezani sa nepovoljnim ishodom lečenja.

Ako se posmatra dinamika postoperativnog oporavka funkcije jetre bolesnika sa cirozom i bez ciroze jetre vrednosti statičkih parametara funkcije jetre nisu se razlikovali između ispitivanih grupa. Postojala je razlika u preoperativnim vrednostima bilirubina i alanin-aminotransferaze između dve grupe ispitanika ali se ova razlika izgubila u postoperativnom periodu. Rezultati lidokainskog testa kod selektovanih bolesnika pokazuju povezanost sa stepenom komplikacija posmatranih u okviru Clavienovog sistema. Rezultati klirensa lidokaina kod ispitivanih bolesnika sa cirozom i bez ciroze jetre pokazuju da se vrednosti klirensa lidokaina 7. postoperativnog dana vraća na preoperativni nivo mada nije nađena statistički značajna razlika klirensa lidokaina 7. postoperativnog dana između dve grupe bolesnika.

Istraživanje je obuhvatilo i analizu regenerativnog potencijala cirotično izmenjene jetre merenjem nivoa IL6 i TNF α u serumu, i njihovom ekspresijom na proteinskom i genskom nivou. Iako je nađena značajna razlika u serumskom nivou IL6 preoperativno i

postoperativno kako kod bolesnika sa cirozom tako i kod bolesnika bez ciroze jetre nije nađena razlika serumskog nivoa IL6 između posmatrane dve grupe ispitanika nezavisno od postoperativne vremenske sekvence uzorkovanja. Svakako da ovaj nalaz ukazuje na to da je IL6 značajan parametar inflamatorne faze regeneracije jetre. S druge strane rezultati određivanja TNF α u serumu ukazuju na to da TNF α nije značajan parametar inflamatorne faze regeneracije jetre. Važan nalaz ovog istraživanja je taj da je IL6 meren na proteinskom nivou u tkivu jetre udaljenom od resekcione margine značajno veći u odnosu na vrednost IL6 u tkivu jetre uz resekcionu marginu ukazujući na činjenicu da tkivo jetre udaljeno od resekcione margine ima izraženu regenerativnu aktivnost u neposrednom postoperativnom periodu. Ako se posmatra genska ekspresija, ekspresija IL6 mRNK pokazala je ushodnu regulaciju u uzorcima tkiva dok je ekspresija TNF α mRNK pokazala dominantno nishodnu regulaciju mada nije nađena razlika u genskoj ekspresiji navedenih citokina između bolesnika sa cirozom jetre i bez ciroze.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U prikazanoj studiji analiziran je 41 bolesnik sa velikom resekcijom jetre. Od tog broja 20 bolesnika je imalo cirozu jetre dominantno hepatitis B etiologije (12 bolesnika) a 21 bolesnik je bio bez ciroze. U odnosu na pol, starost bolesnika, broj i veličinu tumora, segmentnu lokalizaciju tumora, težinu preparata, status resekcione margine, dodatnu operaciju, trajanje operacije i resekcije nije bilo značajne razlike između ispitivanih grupa.

Ishizava i saradnici su u svom radu pokazali da ni multipli tumori ni portna hipertenzija nisu kontraindikacija za resekciju jetre. Ukupno 5-godišnje preživljavanje u grupi Child A bolesnika sa multiplim tumorima je bilo 58% a sa portnom hipertenzijom 56%, a u grupi bolesnika sa Child B cirozom i multiplim tumorima 19%.

U prikazanoj studiji od 20 bolesnika sa cirozom jetre, njih 12 je bilo Child A a 8 bolesnika Child B statusa. Nije pokazana statistički značajna razlika učestalosti postoperativnih komplikacija između bolesnika Child A i Child B statusa. Time ovo istraživanje potvrđuje da je resekcija jetre moguća i kod bolesnika sa ograničenom ili oštećenom funkcijom jetre u uslovima kada je za vreme transekcije parenhima sačuvan protok krvi kroz preostalu jetru.

Već pomenuta studija Ishizawe i saradnika ukazala je na to da je Child B ciroza prediktor lošijeg ukupnog preživljavanja i ranog recidiva bolesti. Međutim većina Child B bolesnika u ovoj studiji je imalo multinodularni HCC za razliku od prikazane studije u kojoj su bolesnici

imali solitarni tumor. Kuroda i saradnici su identifikovali diabetes melitus, preoperativni nivo bilirubina >1.5 mg/dl i Child skor od 8 ili 9 kao nepovoljne prognostičke faktore za resekciju jetre kod Child B bolesnika. U prikazanoj studiji ni jedan bolesnik nije imao Child skor 9.

U revijalnom radu Guglielmi i saradnika prikazane su studije koje su pokazale da kod bolesnika sa portnom hipertenzijom i kompenzovanom funkcijom jetre hirurško lečenje pruža ukupno 5-godišnje preživljavanje od 50%. Prikazani rezultati istraživanja ukazuju na činjenicu da je resekcije jetre moguća kod selektovanih bolesnika intermedijarnog i uznapređovalog stadijuma budući da pruža bolje preživljavanje u odnosu na palijativno i simptomatsko lečenje.

Studija Fana i saradnika još iz 1999. godine je ukazala na ključni napredak u hirurgiji jetre koji je omogućio da se ona danas može ponuditi većem broju bolesnika sa HCCom. U 9-godišnjem periodu analizirano je 330 bolesnika među kojima 49% sa cirozom jetre a najznačajniji nalaz ove analize je smanjenje intraoperativnog gubitka krvi i time potrebe za transfuzijom u poslednje 3 godine posmatranog perioda. Analiza faktora koji utiču na postoperativni morbiditet i mortalitet ukazala je na intraoperativni gubitak krvi, perioperativnu transfuziju i dužinu operacije kao nepovoljne faktore. Autori su zaključili da odgovarajuća hirurška tehnika povezana sa minimalnim gubitkom krvi i očuvanje funkcije preostale jetre omogućava bezbednu resekciju jetre kod bolesnika sa HCCom i da stvara uslove za “nulti” bolnički mortalitet. Day i saradnici su ukazali na napredak hirurške tehnike koja omogućava skoro “nultu” transfuziju u modernoj eri hirurgije jetre s tim da je hirurška tehnika bazirana na operativnom radu dva hepatalna hirurga (“two-surgeon technique”).

Prikazana studija je takođe bazirana na konceptu operativnog rada dva hepatalna hirurga. Radiofrekventna resekciona tehnika upotrebljena u ovoj studiji je povezana sa minimalnim gubitkom krvi i sigurnom hemostazom tokom parenhimske transekcije i najvaskularizovanijih tkiva. Perioperativna transfuzija data je kod 4 bolesnika (1 bolesnik u grupi ciroza dobio 127ml i 3 bolesnika bez ciroze dobili transfuziju u opsegu od 250-980ml). Poređenjem mediane preoperativnog hemoglobina i postoperativnih vrednosti hemoglobina dolazi se do zaključka da je gubitak krvi u najvećoj meri vezan za količinu krvi koja ostaje u preparatu tj. resekovanom parenhimu jetre sa tumorom. Takođe, u ovoj studiji perioperativna transfuzija nije bila povezana sa većom učestalošću postoperativnih komplikacija niti sa lošijim ukupnim preživljavanjem. U prikazanoj studiji dužina operacije (više od 300 minuta) je imala nepovoljan uticaj na ishod lečenja bolesnika sa cirozom jetre budući da je u ovoj populaciji

bolesnika bila povezana sa statistički značajno većom učestalošću postoperativnih komplikacija.

Primenjena RF tehnika resekcije jetre duž linije transekcije parenhima ostavlja zonu devitalizovanog tkiva debljine 5mm što daje dodatnu onkološku sigurnost. Time se može objasniti i rezultat studije koji je pokazao da bolesnici sa R1 resekcionom marginom nisu imali nepovoljnije preživljavanje u odnosu na bolesnike čija je resekciona margina R0.

U revijalnom radu Fana iz 2002. godine najznačajniji faktori rizika za postoperativni morbiditet a koji zahtevaju pažljivu preoperativnu evaluaciju su funkcionalna hepatična rezerva, volumen preostale jetre, godine bolesnika i pridružene bolesti. U prikazanoj studiji nije utvrđeno da je uzrast bolesnika prognostički bitan parametar budući da nije nađena statistički značajna razlika učestalosti postoperativnih komplikacija bolesnika starijih i mlađih od 70 godina.

U prikazanoj studiji vrednosti laboratorijskih analiza (bilirubin, transaminaze, PT) normalizuju se 7. postoperativnog dana i to bez statistički značajne razlike između bolesnika sa cirozom i bez ciroze jetre. Nivo statičkih parametara funkcije jetre u serumu prvog postoperativnog dana u prikazanoj studiji govori u prilog da je RF tehnika povezana sa minimalnim tranzitornim oštećenjem hepatocita za razliku od tehnika koje su bazirane na privremenoj okluziji dovodnih krvnih sudova.

Dva ključna medijatora inflamatorne faze regeneracije jetre ispitivana u ovoj studiji su TNFa i IL6. Taubova grupa je pokazala da blokiranje receptora IL6 onemogućava regeneraciju jetre, a Fausto je u revijalnom radu prikazao ulogu IL6 kao hepatoprotektora i inicijatora prelaska hepatocita iz G0 u G1 fazu ćelijskog ciklusa. Poređenje serumskog nivoa citokina u postoperativnom periodu između zdrave i bolesne jetre prikazano je u radu Lana i saradnika. Kod sedam donorskih hepatektomija (model zdrave jetre) i sedam resekcija jetre kod bolesnika sa HCCom na terenu hepatitis B Child A ciroze (model obolele jetre) meren je nivo IL6, TNFa i CRP u pre i postoperativnom periodu i konstatovano je da zdrava jetra postoperativno relativno brzo normalizuje nivo IL6. Bolesnici sa cirozom jetre su imali značajno viši nivo IL6 postoperativno i proces normalizacije je bio značajno sporiji. TNF alfa nije značajnije odstupao u postoperativnom periodu. U prikazanoj studiji nađena je statistički značajna razlika u serumskom nivou IL6 preoperativno i u postoperativnom periodu (u definisanim sekvencama do 48h) kako kod bolesnika sa cirozom tako i kod bolesnika bez ciroze jetre, ali nije nađena statistički značajna razlika između ove dve grupe ispitanika

nezavisno od postoperativne vremenske sekvence uzorkovanja. Takođe, rezultati dobijeni na serumskom nivou ukazuju na to da je IL6 značajan parametar inflamatorne faze regeneracije jetre dok TNF α nije značajnije odstupao od preoperativnih vrednosti.

Proteinski nivo IL6 meren u tkivu jetre udaljenom od resekcione margine značajno je veći u odnosu na tkivo jetre uz resekcionu marginu ukazujući na činjenicu da tkivo jetre udaljeno od resekcione margine ima izraženu regenerativnu aktivnost u neposrednom postoperativnom periodu. Isto tako nivo IL6 značajno je veći od nivoa TNF α .

Na genskom nivou skspresija IL6 mRNK pokazala je ushodnu regulaciju u uzorcima tkiva dok je ekspresija TNF α mRNK pokazala dominantno nishodnu regulaciju. Takođe nije nađena razlika u genskoj ekspresiji IL6 i TNF α između bolesnika sa cirozom jetre i bez ciroze.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Galun D, Bogdanovic A, Djokic-Kovac J, Bulajic P, Loncar Z, Zuvela M. Preoperative Neutrophil-to-Lymphocyte ratio as a prognostic predictor after curative-intent surgery for hepatocellular carcinoma: experience from a developing country. *Cancer Management and Research* 2018; (Article in Press).

Galun D, Bulajic P, Zuvela M, Basaric D, Ille T, Milicevic MN. Is There any Benefit from Expanding the Criteria for the Resection of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Liver? Experience from a Developing Country. *World J Surg* 2012;36:1657-1665.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Izvodljivost velikih resekcija jetre kod bolesnika sa hepatocelularnim karcinomom i cirozom jetre primenom radiofrekventne energije“ dr Danijela Galuna, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju primene radiofrekventne energije kod resekcija jetre za bolesnike sa hepatocelularnim karcinomom i cirozom jetre. Istraživanje je pokazalo da je radiofrekventna resekcija jetre bezbedna hirurška procedura koja omogućava velike resekcije jetre i kod bolesnika sa kompromitovanom funkcijom jetre kao što bolesnici sa cirozom jetre. Opisana tehnika obezbeđuje adekvatnu hemostazu tokom transekcije parenhima jetre i kod bolesnika sa cirozom jetre. U odnosu na prognostičke parametre jedino je trajanje operacije duže od 300 minuta predstavljalo nepovoljan prognostički parametar kod obe grupe ispitanika. U ovom istraživanju pozitivna resekciona margina, Child B status i

perioperativna transfuzija nisu bili povezani sa nepovoljnijim ishodom lečenja ispitivane grupe bolesnika. Statički testovi funkcije jetre nisu utvrdili nikakvu razliku u dinamici postoperativnog oporavka funkcije jetre bolesnika sa cirozom i bez ciroze. Rezultati klirensa lidokaina kod ograničenog broja ispitivanih bolesnika sa cirozom i bez ciroze jetre pokazali su da se vrednosti klirensa lidokaina 7. postoperativnog dana vraćaju na preoperativni nivo, ali nije nađena razlika između dve ispitivane grupe bolesnika. Rezultati određivanja IL6 u serumu ukazali su na to da je IL6 značajan parametar inflamatorne faze regeneracije jetre dok TNF α to nije. Nivo IL6 meren na proteinskom nivou u tkivu jetre udaljenom od resekcione margine značajno je veći u odnosu na tkivo jetre uz resekcionu margin ukazujući na činjenicu da tkivo jetre udaljeno od resekcione margine ima izraženu regenerativnu aktivnost u neposrednom postoperativnom periodu. Međutim, na proteinskom nivou nije nađena razlika između bolesnika sa cirozom jetre i bez ciroze. Ekspresija IL6 mRNK pokazala je ushodnu regulaciju u uzorcima tkiva dok je ekspresija TNF α mRNK pokazala dominantno nishodnu regulaciju.

U celini prikazana studija potvrđuje da je RF resekcija jetre bezbedna hirurška procedura povezana sa minimalnim morbiditetom, a koja obezbeđuje preživljavanje bolesnika koje odgovara rezultatima drugih resekcioničkih tehnika. Njena prednost je u tome što pruža adekvatnu hemostazu i što se može primeniti i kod bolesnika sa kompromitovanom funkcijom jetre.

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 Mr sci med dr Danijela Galuna i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 16.04.2018

Članovi Komisije:

Prof. dr Rada Ješić Vukićević

Prof. dr Marinko Žuvela

N.Sar dr Sanja Stanković

Mentor:

Prof. dr Miroslav Milićević
