

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/18-CM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Ispitivanje prognostičkog značaja faktora hipoksije, metaboličkih markera i markera neoangiogeneze u ranom invazivnom karcinomu grlića materice“

kandidata dr Svetlane Milenković, zaposlene u Službi za patohistologiju KCS u Beogradu.
Mentor je prof.dr. Tatjana Terzić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Jelena Sopta, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Vesna Kesić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. Dr Živka Eri, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

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 Svetlane Milenković napisana je na ukupno 130 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 34 tabele i 24 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, biografiju kandidata, kao i izjave o autorstvu.

U uvodu je ukazano na problem visoke incidencije oboljevanja od raka grliće materice koji postoji u velikom broju zemalja bez sprovedenog organizovanog skrining programa. Navedena je detaljna klasifikacija stadijuma tumorske bolesti po FIGO kriterijumima. Na adekvatan način su navedene mogućnosti hirurškog lečenja, sa ili bez primene dodatnog zračnog tretmana ili hemioterapije. Takođe su prikazana dosadašnja saznanja vezana za prognostički značaj pojedinih patohistoloških parametra kao što su veličina tumora,

histološki tip i gradus tumora, dubina infiltracije tkiva grlića i prisustvo limfnovaskularne invazije. Poslednjih godina počela je upotreba ciljane onkološke terapije, koja se primenjuje u zavisnosti od prisustva ekspresije pojedinih bioloških markera i njenog procenjenog intenziteta. U uvodu je dat detaljan opis najnovijih saznanja o metabolizmu, funkciji, genskoj ekspresiji, poznatim signalnim putevima i načinima stimulacije i inhibicije bioloških markera – HIF-1alfa, GLUT1, c-Met, CA IX i VEGF od kojih se pojedini već koriste kao ciljana terapija kod tumora primarnog porekla izvan grlića materice.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od određivanja prisustva ekspresije markera hipoksije, metaboličkih markera i markera neoangiogeneze, uz procenu intenziteta njihove ekspresije u ranim invazivnim karcinomima grlića materice. Takođe, kao cilj je definisano utvrđivanje korelacije navedenih markera sa već poznatim patološkim parametrima, kao i razlike u ekspresiji imunohistohemijskih markera u grupi ranih invazivnih karcinoma grlića materice između stadijuma FIGO IA i FIGO IB1 \leq 20mm. Jedan od zadatih ciljeva je bilo određivanje prognostičkog značaja ovih bioloških markera.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je sprovedena na Klinici za ginekologiju i akušerstvo i na Odeljenju Ginekološke patologije Službe za patologiju KCS. Detaljno su opisani kriterijumi za uključivanje u studiju, kao i kriterijumi za isključivanje iz studije. Opisana je tehnička procedura pravljenja tkivnih mikronizova, kao i izvođenja imunohistohemijskih bojenja za svako ispitivano antitelo. Takođe, data je skala po kojoj je vršena procena nivoa ekspresije bioloških markera (način skorovanja) i definisana njihova pozitivna kontrola. Navedene su korišćene statističke metode obrade podataka. 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 222 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U studiju je bilo uključeno 176 pacijentkinja kojima je definitivnom patohistološkom analizom potvrđena dijagnoza ranih invazivnih karcinoma grlića materice. U ovoj grupi je bilo 132 pacijentkinje u stadijumu FIGO IB1 ≤ 20mm i 44 stadijuma FIGO IA. 19 pacijentkinja je bilo stadijuma FIGO IA2, a 25 stadijuma FIGO IA1. Sve pacijentkinje stadijuma FIGO IA su bile praćene i nisu imale dodatni onkološki tretman. 40 žena stadijuma FIGO IB1 su posle operacije (radikalne histerektomije sa pelvičnom limfadenektomijom) imale zračni tretman. Prosečna starost pacijentkinja je bila 46,58±9,371 godina. Nije utvrđena statistički značajna razlika po godinama starosti između žena stadijuma FIGO IB1 i FIGO IA. Prosečne dimenzije tumora u grupi FIGO IA su bile: dužina 5,34mm, širina 4,18mm i dubina 2,80mm. U grupi FIGO IB1 prosečna dužina tumora je bila 14,08mm, širina 12,32mm i dubina 8,95mm. U skoro jednakom broju slučajeva (48 i 47 pacijentkinja) u okviru stadijuma FIGO IB1 je postojala infiltracija druge (srednje) i treće (duboke) trećine debljine zida cerviksa. U grupi FIGO IA tumor je pokazivao plitku, početnu invaziju zida sa zahvatanjem samo njegove prve trećine. 168 karcinoma imalo je skvamocelularnu diferencijaciju, a samo 8 slučajeva je bilo žlezdanog porekla. U 40 slučajeva invazivnog skvamocelularnog karcinoma stadijuma FIGO IB1 je postojala invazija limfnih i/ili vaskularnih prostora (LVI). Na osnovu utvrđenih parametara (maksimalne veličine tumora, dubine infiltracije zida i postojanja LVI), naknadno je za svaku pacijentkinju izračunat GOG skor. Maksimalna vrednost GOG skora u stadijumu FIGO IB1 je bila 266, a u stadijumu FIGO IA 20, dok je minimalna vrednost u obe grupe bila 1. Tako je utvrđena prosečna vrednost GOG skora u stadijumu FIGO IB1 od 55,83±40,61 (minimalna vrednost GOG skora za postoperativni radiotretman je 120).

Stepen ekspresije HIF-1alfa kao i drugih ispitivanih markera je izračunavan kao proizvod intenziteta i % pozitivnih tumorskih ćelija i iskazan na skali 0-12. Vrednost 1-4 je smatrana slabom, 5-8 umerenom a 9-12 jakom ekspresijom. U grupi FIGO IB1 najveći broj slučajeva je imao slabu ekspresiju (62/176 – 47,3%), a jaka je bila prisutna u 18,3%. U grupi FIGO IA 54,5% slučajeva je imalo umerenu ekspresiju, tako da je utvrđena statistički značajna razlika – veći nivo ekspresije je bio u grupi mikroinvazivnih tumora u odnosu na stadijum FIGO IB1. U FIGO IB1 stadijumu metabolički marker, GLUT1, je u bio 5/176 slučajeva negativan, a 51,9% slučajeva je imao slabu pozitivnost. U grupi mikroinvazivnih tumora reakcija umerenog stepena je bila prisutna u polovini slučajeva, dok negativne reakcije nije bilo. Tako je utvrđena značajna razlika po učestalosti ekspresije GLUT1 (p=0,028) – veća je u FIGO IB1 stadijumu, ali razlike po trendu nije bilo (p=0,319). Interesantno je ekspresija c-Met, CA IX i

VEGF u najvećem broju slučajeva u obe grupe bila slabog intenziteta. Kod 9 slučajeva stadijuma FIGO IB1 i 4/44 FIGO IA imunohistohemijske reakcije (IHC) na c-Met nije bilo. Samo 6/176 slučajeva tumora FIGO IB1 je imalo jaku ekspresiju, dok u grupi FIGO IA nije utvrđen nijedan slučaj. Pri metodološki definisanoj statistički značajnoj razlici $p < 0,05$ u kategoriji c-Met pokazana je veća ekspresija u stadijumu FIGO IB1 u odnosu na mikroinvazivne tumore ($p = 0,007$). CA IX ekspresija je dominantno bila slabog intenziteta (76/176) ili je nije bilo (53/176) u stadijumu FIGO IB1, što zajedno obuhvata čak 97,7% slučajeva od ukupno 176. U grupi mikroinvazivnih tumora nije bilo umerene niti jake reakcije, tako da je χ^2 testom utvrđena značajno veća ekspresija CA IX u FIGO IB1 stadijumu. Između ova dva stadijuma nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji VEGF:

Zatim je urađena korelacija IHC ekspresije ovih markera i GOG skora. Nije utvrđena značajna povezanosti između ovih parametara, osim za metabolički marker c-Met. Pokazano je da je što je veći GOG skor i dubina infiltracije, to je veća ekspresija c-Met, ali je i ova korelacija slaba i na granici je konvencijalnog nivoa značajnosti ($p = 0,05$). U stadijumu FIGO IB1 utvrđena je značajna ali slaba korelacija između gradusa tumora i ekspresije HIF-1alfa ($p = 0,022$). Ona je pozitivnog smera - veća ekspresija HIF-1alfa je udružena sa većim gradusom tumora. Ekspresija c-Met i VEGF nije bila povezana sa stepenom tumorske diferencijacije. Limfovaskularna invazija nije bila povezana sa ekspresijom HIF-1alfa, GLUT1, CAIX niti VEGF, ali jeste sa ekspresijom c-Met. Statistička značajnost se nalazila na granici konvencijalnog nivoa, $p = 0,042$.

Spearmanovim testom korelacije na nivou značajnosti 0,05 utvrđeno je da postoji značajna povezanost ekspresije HIF-1alfa sa drugim ispitivanim markerima, ona je pozitivnog smera – što je veća ekspresija HIF-1alfa veći je intenzitet ekspresije GLUT1, c-Met, CAIX i VEGF. Takođe, postoji značajna koeskresija metaboličkih markera (GLUT1, c-Met i CA IX) sa markerom neoangiogeneze – VEGF.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Do danas, nijedna studija nije urađena na temu povezanosti malih invazivnih tumora stadijuma FIGO IB1 I FIGO IA sa ekspresijom markera HIF-1alfa, GLUT1, c-Met, CA IX i VEGF u smislu njihovog prognostičkog značaja. Brojni radovi u svetu su objavljeni na temu prognostičkog značaja naših ispitivanih markera i unapredovale tumorske bolesti u slučajevima invazivnih karcinoma grlića, ali su dobijeni zaključci veoma različiti. U radu

Huang i koautora iz 2014. godine, ekspresija HIF-1alfa je prisutna u 94,6% slučajeva, uz značajnu povezanost sa FIGO stadijumom, što mi su svom radu nismo dobili. U našoj studiji HIF-1alfa je pokazivao veću ekspresiju u mikroinvazivnim tumorima u odnosu na grupu FIGO IB1 \leq 20mm, što se slaže sa zaključcima Liu-a iz 2016. godine. Ovaj autor je zaključio da je endogeni marker hipoksije uključen u prve faze nastanka tumora, dovodeći ga, baš kao Sen i saradnici u svom radu iz 2018.godine u vezu sa visokoonkogenim Humanim Papilloma Virusom (HPV), koji započinje proces maligne transformacije preko svojih onkoproteina E6 i E7. Durzynska i koautori u svojoj objavljenj studiji iz 2017. takođe smatraju da HIF-1alfa ima pojačanu aktivnost u početnim fazama invazije, na koju smo i mi u svom radu ukazali.

U našem radu takođe nije dobijena povezanost GLUT1 ekspresije sa dubinom infiltracije zida grlića niti GOG skorom u stadijumu FIGO IB1. Mendes navodi da ekspresija GLUT1 raste od preinvazivnih ka invazivnim promena, sugerišući da je unos glukoze kasni događaj u tumorskoj transformaciji. Kanjanapan u radu iz 2017. nije dobio povezanost GLUT1 sa gradusom tumora, što je isti zaključak koji smo i dobili u svojoj ispitivanoj grupi.

Rezultati koji povezuju ekspresiju c-Met sa patološkim parametrima karcinoma grlića su takođe neujednačeni. Hass u 2017.dobija pozitivnost karcinomskih ćelija primarnih urogenitalnih tumora u 70% ćelijskih populacije, što je približna vrednost koju smo dobili u svom radu (63,6%). Do sličnih rezultata dolaze Peng i saradnici 2016. navodeći da je 60,66% cervikalnih carcinoma pokazivalo c-Met ekspresiju što je skoro identično našoj dobijenoj vrednosti. U istoj studiji Penga c-Met je veći kod invazivnih u odnosu na preinvazivne promene, što odgovara našem zaključku da je ekspresija c-Met bila veća u FIGO IB1 stadijumu u odnosu na FIGO IA stadijum. Međutim, Peng nije dobio korelaciju sa dubinom infiltracije i GOG skorom, što mi jesmo. Chen 2017. je došao do sličnih zaključaka u svom radu, ističući da ekspresija c-Met nije povezana sa gradusom tumora, objašnjavajući to velikim brojem srednje diferentovanih (G2) tumora. U grupi naših 176 slučajeva, sa najvećim brojem G2 tumora, takođe nije bilo povezanosti c-Met i tumorskog gradusa. Koliko je ova tema aktuelna, pokazuje i veliki broj radova poslednjih godina, koji povezuju c-Met i HPV infekciju u nastanku skvamocelularnog karcinoma na različitim lokalizacijama.

Ispitivanja povezanosti CA IX ekspresije i malignih tumora do sada je retko rađena na tumorima primarne ginekološke lokalizacije. U radu Darcy i Liao se zaključuje da ekspresija CA IX jeste povezana sa veličinom tumora, što se uklapa u naše rezultate (ekspresija CA IX je bila veća u stadijumu FIGO IB1 u odnosu na mikroinvazivne tumore), ali nije povezana sa

gradusom tumora. Isti zaključak izvode Kim i saradnici (2013.) kod kojih nije ustanovljena relacija gradus tumora – intenzitet ekspresije CA IX.

Zhang u radu iz 2017. Kaže da je “prognostička uloga VEGF u cervikalnom karcinom do danas ostala kontroverzna”. Wang u svojoj analizi iz 2017. dobija pozitivnost VEGF u 61% cervikalnih carcinoma, povezujući ga gradusom tumora, stadijum tumorske bolesti i veličinom tumora, što mi u svom radu nismo dobili. Naši zaključci se podudaraju sa radom Rahmani i koautora iz 2018. koji nisu ustanovili korelaciju ovih patoloških parametara i VEGF ekspresije.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Milenkovic S, Terzic T, Vranes B, Soldatovic I. HIF1 alpha and SOX2 expression in squamous cell cervical carcinoma. Vojnosanitetski pregled, 2018 OnLine-First March (00): 43-43 . doi.org/10.2298/VSP171213043M

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Ispitivanje prognostičkog značaja faktora hipoksije, metaboličkih markera i markera neoangiogeneze u ranom invazivnom karcinomu grlića materice“ dr Svetlane Milenković, kao prvi ovakav rad u dosadašnjim studijama predstavlja originalni naučni doprinos u sagledavanju značaja ekspresije HIF-1alfa, GLUT1, c-Met, CA IX i VEGF kod ranih invazivnih karcinoma grlića. Do sada sprovedene studije su pokazale da postoji korelacija između navedenih markera i uznapredovalih cervikalnih karcinoma, čime se oni izdvajaju kao loši prognostički parametri. U našem radu nismo utvrdili njihov prognostički značaj u odnosu na tumore stadijuma FIGO IB1≤20mm i FIGO IA. Pokazali smo da u stadijumu FIGO IB1 postoji veća ekspresija metaboličkih markera, GLUT1, c-Met i CA IX. Međutim, u stadijumu FIGO IA – grupa mikroinvazivnih tumora, postojala je veća ekspresija HIF-1alfa u odnosu na stadijum FIGO IB1≤20mm, što potvrđuje sve više prihvaćeno mišljenje da faktor hipoksije tumorske mikrosredine ima ključnu ulogu u ranoj karcinogenezi. Između stadijuma FIGO IB1≤ 20mm I FIGO IA nije bilo razlike u VEGF ekspresiji. Između markera hipoksije, HIF-1alfa, metaboličkih markera GLUT1, c-Met, CA IX i markera neoangiogeneze, VEGF, je pokazana pozitivna međusobna korelacija ekspresije.

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 Svetlane Milenković i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 28. 06.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Jelena Sopta

Prof. dr Vesna Kesić

Prof.dr Živka Eri

Mentor:

Prof.dr Tatjana Terzić
