

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 25.12.2014. godine, broj 4600/12, imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom:

**„Imunohistohemijski prognosti ki biomarkeri u difuznom B krupno elijskom
limfomu“**

kandidata mr sci dr Maje Peruni i Jovanovi , zaposlene u kabinetu za hematopatologiju, Službe za patohistologiju, Klini kog Centra Srbije u Beogradu. Mentor doktorske disertacije je Prof. dr Biljana Mihaljevi , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ivan Bori i – redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Milena Todorovi – vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Slavica Kneževi Ušaj - vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu slede i

I Z V E Š T A J

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Maje Peruni i Jovanovi , pod nazivom „Imunohistohemijski prognosti ki biomarkeri u difuznom B krupno elijskom limfomu“, napisana je na 95 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati,

diskusija, zaključak i literatura. Disertacija sadrži 11 tabela, 24 slike i 37 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena korištenih u tekstu.

U uvodu se razmatra aktuelnost teme, posebno u odnosu na studije koje su ispitivale prognostičke faktore koji bi predvideli preživljavanje i optimizovale terapijsku strategiju kod pacijenata sa Difuznim B krupno elijskim limfomom. Data je definicija bolesti u skladu sa najnovijom klasifikacijom Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), kao i istorijski osvrt na klasifikaciju limfoproliferativnih bolesti koja je stalno evoluirala, počevši od ranih godina 19. veka pa do danas.

Objašnjava se poreklo zrelih B elijskih neoplazmi kao osnov za klasifikaciju i opisane su morfološke, biološke i kliničke karakteristike pojedinih tipova DBKL. Detaljno se objašnjava princip dijagnostike DBKL, na osnovu imunohistohemijskih i molekularnih karakteristika ovih tumora. Posebno detaljno su prikazani molekularni biomarkeri koji su obuhvaćeni daljim istraživanjem u radu, a u cilju izdvajanja pacijenata sa većim rizikom za progresiju bolesti, što bi bilo od značaja za terapijsku strategiju. Naznačena je važnost biopsije kostne srži, koja se rutinski primenjuje u određivanju kliničkog stadijuma kao i procene stanja kostne srži nakon primenjene terapije kod pacijenata sa non-Hodgkin limfomom.

Detaljno je dat opis osnovnih kliničkih parametara koji se koriste za predviđanje ishoda bolesti kao i standardni terapijski pristup za pacijenata sa DBKL.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani i primereno obrazlažu istraživanje. Cilj rada je bio da se utvrdi klinički značaj i prognostičke vrednosti imunofenotipskih podtipova DBKL: GCB i non-GCB, kao i korelacija ovih podtipova sa Internacionalnim prognostičkim indeksom (IPI).

Osim toga, cilj je bio analiza ekspresije onkogenih, proliferativnih, i markera uključenih u apoptozu i korelacija sa podtipovima DBKL i ishodom bolesti.

U poglavlju Materijal i Metode navedeno je da je za istraživanje korišten biopsijski materijal 115 bolesnika sa dijagnozom DBKL koji su dijagnostikovani i lečeni na Klinici za Hematologiju Kliničkog Centra Srbije u Beogradu, u periodu od 2000-2006. godine. Predstavljen je postupak dijagnostike DBKL, odnosno histopatološke i imunohistohemijske analize uzoraka limfnog tkiva dobijenog biopsijom limfnog čvora, kostne srži ili drugih ektranodalnih lokalizacija, prema kriterijumima klasifikacionog sistema Svetske Zdravstvene Organizacije. Opisana je imunohistohemijska analiza, sprovedena korištenjem sledećih

monoklonskih antitela: CD20, CD79, CD3, CD5, CD10, bcl-2, bcl-6, MUM-1, CD138, CD30, HLA-DR, Survivin, BAX, p53, myc i Ki67.

Tako je opisana je metoda metode tkivnog mikroniza (tissue microarray -TMA), koja je sprovedena kod 67 pacijenata, za koje je bio dostupan arhivirani biopsijski materijal adekvatan za dalju analizu. Osim imunohistohemijske analize na ovim uzorcima urađena je i metoda fluorescentne in situ hibridizacije i to za MYC i BCL2.

Opisan je način obrade kliničkih podataka kao i način lečenja.

Metodološki pristup objašnjen je posebnim odeljcima: Histološka i imunohistohemijska analiza, Tkivni mikroniz, Imunohistohemijski algoritmi, Metoda Fluorescentne in situ hibridizacije, Klinički parametri i Statistička obrada rezultata.

U poglavlju **Rezultati** su izneti originalni podaci koji su dobijeni u ovom istraživanju, pregledno i sistematično predstavljene, a sistematizovani su u skladu sa postavljenim ciljevima.

Diskusija dobijenih rezultata napisana je jasno i pregledno, uz integrativni pristup problematici definisanja nezavisnih kliničkih, patohistoloških i imunohistohemijskih prognostičkih parametara koji bi izdvojili visokorizičnu grupu pacijenata pre otpočinjanja terapije i kandidovale je za dodatne terapijske modalitete.

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

Korišćena **literatura**, sadrži spisak od 171 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje je pokazalo da je Internacionalni prognostički indeks nezavisan prognostički parametar ishoda bolesti kod pacijenata sa difuznim B krupno elijskim limfomom.

Petogodišnje ukupno preživljavanje kao i period bez neželjenog događaja, u grupi pacijenata koji su lečeni hemioterapijom i Rituximab-om, bilo je značajno bolje u odnosu na pacijente koji su lečeni standardnom hemioterapijom bez Rituximab-a.

Imunohemioterapija je značajno poboljšala preživljavanje pacijenata koji su imali Bcl-2 pozitivan, kao i Bcl-6 negativan DBKL, ali nije imala uticaj na preživljavanje Bcl-2 negativnih, a ni Bcl-6 pozitivnih slučajeva. Imunohistohemijski algoritam subtipizacije, bazirane na poretku elije (COO), u skladu sa Hans i saradnicima, nije bio prediktor preživljavanja pacijenata sa DBKL bez obzira na primenjenu terapiju. Uestalost non GCB podtipa u analiziranoj grupi bolesnika je znatno veća nego u drugim objavljenim studijama.

Ekspresija nijednog imunohistohemijskog markera nije imala značajan uticaj na preživljavanje kao ni na postizanje kompletne remisije, međutim, utvrđena je korelacija između u pojedinim imunohistohemijskih biomarkera i kliničkih parametara. Značajna pozitivna korelacija je postojala između u Ki67>60% tumorskih oblika i visokog IPI skora, ekspresije survivina i Bcl-6 i voluminozne tumorske mase, kao i ekspresije BAX, p53 i visokog kliničkog stadijuma.

Ne postoje kliničke, morfološke ili imunofenotipske karakteristike koje bi identifikovale postojanje genetskih aberacija, pa je neophodno uraditi FISH analizu u cilju njihove identifikacije i korelirati ih sa imunohistohemijskom ekspresijom proteina.

Navedeni podaci mogu biti od kliničkog značaja, jer mogu lako biti primenjeni u svakodnevnoj rutinskoj praksi u smislu klasifikacije DBKL i neophodnog biološkog uvida u prilagođen terapijski pristup.

C) Uporedna analiza rezultata doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U doktorskoj disertaciji pregledno i temeljno su upoređivani rezultati ovog istraživanja sa relevantnim nalazima drugih autora koji se bave kliničko-patološkim analizama difuznog B-krupno obliškog limfoma. Pregled literature daje vrlo heterogene podatke o prognosti kom značaja pojedinih kliničko-patoloških i imunohistohemijskih parametara.

Internacionalni prognostički indeks je prognostički model koji se koristi u predviđanju terapijskog odgovora i ishoda bolesti kod pacijenata sa DBKL, tako što većina autora tvrdi da samo IPI skor ima važnu ulogu u prognozi preživljavanja pacijenata sa DBKL (Sehn i sar. 2007; Barton i sar. 2012.). U skladu sa rezultatima drugih autora, u našoj studiji, visok IPI (>2) je identifikovan kao nezavisan prognostički faktor koji utiče na ukupno preživljavanje pacijenata lečenih samo hemioterapijom tako i onih koji su lečeni imunohemioterapijom.

Odkako je rituximab dodat CHOP protokolu, postignut je značajan napredak u preživljavanju, tako da je R-CHOP postao standardni terapijski protokol u lečenju pacijenata sa DBKL (Coiffier i sar., 2002; Fu i sar. 2008). GELLA (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte) grupa je prvi put objavila randomizovanu studiju, koja je pokazala da dodavanje anti-CD20 monoklonskog antitela CHOP hemioterapiji, kod starijih pacijenata (>60 godina) sa DBKL, značajno poboljšava ishod bolesti. U našoj grupi bolesnika, petogodišnje ukupno preživljavanje pacijenata koji su lečeni hemioterapijom i rituximab-om, bilo značajno bolje u odnosu na pacijente koji su lečeni standardnom terapijom bez rituximab-a (61% vs 38%, log rank $p=0,007$).

S obzirom na to da GEP nije deo rutinske dijagnostičke procedure, predloženo je nekoliko IHH algoritama koji mogu poslužiti kao surogat za GEP analize, ali sa različitim nivoom uspešnosti (Hans i sar. 2004; Colomo 2003; Choi i sar. 2009.). Studija Garcia i saradnika je pokazala da nijedan od 5 analiziranih IHH algoritama baziranih na GCB i non GCB podtipu, nije u mogućnosti da predvidi ukupno preživljavanje i preživljavanje do progresije bolesti. U našoj studiji, GCB versus non GCB imunofenotip u skladu sa algoritmom Hans i saradnika nije imao prognostički uticaj na ukupno preživljavanje ni u CHOP ni u RCHOP terapijskoj grupi, što je u saglasnosti sa nalazima većine autora (Garcia 2011).

Rezultati GEP studija su u saglasnosti sa imunohistochemijskim studijama koje su identifikovale Bcl-6 kao prognostički faktor (Winter i sar. 2006; Lossos i sar. 2001; Imhoff i sar. 2006.). Nekoliko različitih grupa autora je pokazalo da je ekspresija Bcl-6 proteina sama po sebi, ili u kombinaciji sa drugim markerima germinativnog centra, prediktor boljeg ishoda bolesti pacijenata sa DBKL le enih hemioterapijom sa antraciklinom (Lossos i sar. 2006; Barrans i sar. 2002; Hans i sar. 2004.). Winter i saradnici su u svojoj studiji pokazali, da je ekspresija Bcl-6 proteina snažan prediktor ishoda bolesti pacijenata sa DBKL le enih hemioterapijom, ali da Bcl-6 status nije prognostički marker kod pacijenata sa DBKL le enih imunochemioterapijom. Osim toga ista grupa autora je pokazala da Bcl-6 negativni slučajevi le eni RCHOP-om imaju duže preživljavanje od onih koji su le eni samo CHOP terapijom.

Naša studija je pokazala da pacijenti sa Bcl-6 negativnim DBKL su imali značajno bolje preživljavanje u RCHOP grupi nego u grupi pacijenata le enih samo standardnom terapijom. Dodavanje Rituximab-a standardnoj terapiji značajno poboljšava ishod bolesti kod Bcl-6 negativnih, ali ne i kod Bcl-6 pozitivnih slučajeva, što je u saglasnosti sa većinom studija.

Prognostički značaj Bcl-2 ekspresije je takođe kontroverzan i poreklo je izmeđ u različitim studijama je otežano pre svega zbog izbora različitih granica vrednosti pozitivnosti ekspresije, ali i različitih terapijskih tretmana (de Jong i sar. 2007; Saez i sar. 2004, Tzankov i sar. 2010.). Iako su u različitim studijama korišćeni različiti procenti koji definišu Bcl-2 pozitivnost, procenat pozitivnih slučajeva (45-66%) u većini objavljenih studija je u saglasnosti sa procentom korišćenim u našoj studiji (50%).

U studiji GELLA grupe je pokazano da je ekspresija Bcl-2 proteina prognostički faktor kod pacijenata sa DBKL le enih CHOP ali ne i u grupi pacijenata le enih RCHOP terapijom. U studiji Visco i saradnika ekspresija Bcl-2 je bila udružena sa značajno lošijim ishodom posmatrano na celoj grupi pacijenata uniformno le enih RCHOP, ali kada se

pacijenti podele u grupe u skladu sa GEP, primećeno je da je već ekspresija Bcl-2 udružena sa lošijim PFS u GCB podgrupi ali ne i u ABC podgrupi. Takođe, ista grupa autora je pokazala da je prognostički efekat ekspresije Bcl-2 proteina vezan za istovremeno prisustvo BCL2 translokacije. U studiji Winter i saradnika kao i Hans i saradnika Bcl-2 ekspresija nije bila prognostički parametar. U nekim studijama je pokazano da dodavanje rituximab-a eliminiše negativan uticaj ekspresije Bcl-2 (Mounier i sar. 2003; Iqbal i sar. 2006.).

Naša studija je pokazala da ekspresija Bcl-2 proteina nije imala uticaj na ukupno preživljavanje ni u grupi pacijenata sa lezijama R-CHOP-om, ni u grupi koja je ležena samo standardnom hemioterapijom bez rituximab-a. Dalje, potvrdili smo da rituximab značajno poboljšava ishod bolesti kod Bcl-2 pozitivnih, ali ne i kod Bcl-2 negativnih slučajeva, što je u saglasnosti sa skorije objavljenim studijama.

Incidenca genetskih promena, kao i MYC i BCL2 proteinska ekspresija u našoj grupi bolesnika bila je slična podacima drugih autora (Green i sar. 2012; Johnson i sar. 2009.). Nije utvrđena korelacija između BCL2 i MYC rearanžmana ili MYC proteinske ekspresije u odnosu na postizanje kompletne remisije ili ukupno preživljavanje. Mali broj uniformno tretiranih pacijenata sa genskim alteracijama i imunohistohemijskom ekspresijom MYC proteina u našoj studiji, ograničeno je statističku korelaciju sa ishodom.

Neke studije su utvrdile da je preživljavanje značajno kraće kod pacijenata sa nuklearnom ekspresijom Ki 67 u 60% ili 80% i više tumorskih lezija (Lossos i sar. 2006. Tzankov i sar. 2010.). Studije većine autora nisu utvrdile prognostički značaj Ki 67 (Colomo i sar. 2003; Saez i sar. 2004; Winter i sar. 2006.). U našoj studiji smo pokazali statistički značajnu pozitivnu korelaciju između Ki67>60% tumorskih lezija i visokog IPI skora, ali ekspresija Ki 67 nije uticala na ukupno preživljavanje.

U pojedinim studijama je pokazan uticaj P53 mutacije i ekspresije p53 na preživljavanje (Kramer i sar. 1996; Chang i sar. 2000.), dok neki autori nisu našli značajnu povezanost između p53 ekspresije i bilo koje od kliničkih varijabli i ishoda (Visco i sar. 2006.). Naša studija je pokazala da ekspresija p53 korelira sa kliničkim manifestacijama bolesti, posebno visokim kliničkim stadijumom i nodalnim poreklom DBKL.

U studiji Bai i saradnika ekspresija BAX gena je već bila udružena GCB podtipom, dok je u našoj studiji većina pacijenata sa ekspresijom Bax, bila iz non-GCB grupe. Gaskoyne i saradnici nisu dokazali prognostički značaj ekspresije Bax proteina u DBKL, ali su uočili da su pacijenti iz Bcl2-/Bax- grupe pacijenata imali nešto kraće ukupno preživljavanje od pacijenata iz bcl-2-/Bax+ grupe. U našoj grupi pacijenata, velika većina (88%) je imala

koekspresiju bcl-2 i Bax, i korelirala je sa visokim IPI i kliničkim stadijumom bolesti, ali tako e nismo uspeli da dokažemo prognosti ki zna aj ekspresije Bax proteina.

Ekspresija survivina je uo ena kod 83,56% ispitivanih pacijenata u našoj studiji što je u saglasnosti sa nalazom drugih autora (Adida i sar. 2000; Liu i sar. 2007.). Dok su Adida i saradnici utvrdili da ekspresija survivina lošije uti e na ukupno preživljavanje pacijenata sa DBKL, u našoj studiji, kao i u studijama korejskih i kineskih autora nije utvr en prognosti ki zna aj ekspresije survivina (Liu i sar. 2007; Sung i sar. 2010.).

D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske teze

Maja Perunicic Jovanovic, Biljana Mihaljevic, Ljubomir Jakovic, Vesna Cemerikic Martinovic, Marija Dencic Fekete, Bosko Andjelic, Darko Antic, Andrija Bogdanovic, Novica Boricic, Tatjana Terzic, Jelena Jelicic, Sanja Milenkovic. **BCL2 positive and BCL6 negative diffuse large B cell lymphoma patients benefit from R-CHOP therapy irrespective of germinal and non germinal center B cell like subtypes.** (rad je prihva en za objavljivanje dana 07.10.2014. i bi e objavljen u J BUON Vol.20,no3,2015.)

E) Zaključak (obrazloženje nau nog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Imunohistochemijski prognosti ki biomarkeri u difuznom B krupno elijskom limfomu**“ kandidata mr sci dr Maje Peruni i Jovanovi , predstavlja originalni nau ni doprinos istraživanjima u oblasti hematopatologije, posebno difuznog B krupno elijskog limfoma. Reklasifikacija DBKL u skladu sa najnovijom klasifikacijom SZO, kao i sveobuhvatna imunohistochemijska analiza u skladu sa predloženim algoritmima, FISH analiza kao i ispitivanje kliničko-patoloških parametara zna ajnih za prognozu i terapiju DBKL, sprovedeno je po prvi put na ovaj na in u našoj zemlji. Ova doktorska disertacija ura ena je prema svim principima nau nog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup je bio originalan, a metodologija rada je bila kompleksna i savremena, uz integrisan kliničko-patološki pristup problemu. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaključci.

Na osnovu navedenog, Komisija smatra da doktorska disertacija „**Imunohistohemijski prognosti ki biomarkeri u difuznom B krupno elijskom limfomu**“ kandidata mr sci dr Maje Peruni i Jovanovi , predstavlja originalni nau ni doprinos i predlaže Nau nom ve u da prihvati priloženu disertaciju i odobri njenu javnu odbranu.

U Beogradu, 27.02.2015. godine

Mentor

lanovi Komisije:

Prof. Dr Biljana Mihaljevi , redovni profesor

Prof. dr Ivan Bori i , redovni profesor

Prof. dr Milena Todorovi , vanredni profesor

Prof. dr Slavica Kneževi Ušaj, vanredni profesor