

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRAD

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 naslovom:

**„Zna aj odre ivanja koncentracije osteopontina u plazmi kao pokazatelja prisustva malignih tumora jajnika”**

kandidata Prim mr sci ph Mirjane Milivojevi , specijaliste medicinske biohemije zaposlene u Centru za medicinsku biohemiju, Klini kog centra Srbije. Mentor je Prof. dr Nataša Petronijevi , komentor je Prof. dr Biljana Kastratovi -Kotlica.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Lidija Tasi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Vesna Dragutinovi , docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Vladimir Boškovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu, u penziji

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakultet

## IZVEŠTAJ

### A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci ph Mirjane Milivojević napisana je na 137 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi 40 tabela i 27 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena imena korištenih u tekstu.

U **uvodu** su definisane neoplazme ovarijuma, nabrojane njihove klasifikacije i faktori rizika za njihov nastanak. Opisani su dijagnostički testovi i prognostički modeli koji se danas koriste u predikciji ovarijalnih kancera sa posebnim osvrtom na tumor markere. Detaljno su opisana dosadašnja saznanja o fosfolipoproteinu osteopontinu (OPN), njegova uloga u fiziološkim i patološkim procesima u organizmu.

OPN koji pripada familiji hemokina učestvuje u brojnim inflamatornim i imunološkim procesima, u vaskularnoj kalcifikaciji i restenoziji, angiogenezi i remodeliranju koštanog skeleta, formiranju dentina i dr. Ovaj protein, koji postoji u intracelularnoj i ekstracelularnoj formi, igra ključnu ulogu u regulisanju tumorskih metastaza. Opisana je sposobnost OPN-a da se veže za CD44 – ERM receptore kao i za neke integrinske receptore (α1, α3 i α5) što dovodi do aktivacije nishodnih signalnih puteva (Ras, PI3k, Akt, MAPK i NF-κB i mTOR) koji vode ka promenama u tumorskim ćelijama invaziji u ekstracelularni matriks regulacijom matriks metaloproteinaza (MMP) i urokinaza plazminogen aktivatora (uPAs), povećanoj migraciji i adheziji tumorskih ćelija i inhibiciji apoptoze i progresiji tumora. Detaljno je opisana njegova uloga u regulisanju ćelijskih signala koji kontrolišu tumorsku progresiju i nastajanje metastaza.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju značajnog određivanja OPN-a u predikciji epitelnih kancera ovarijuma. Ispitano je da li postoje uslovi da se OPN ispituje kao marker ovarijalnih kancera da li postoji povišena koncentracija ovog proteina u krvi bolesnica sa ovarijalnim kancerom, da li postoji razlika u koncentraciji ovog proteina između u ispitivanih grupa (grupe zdravih ispitanica, bolesnica sa benignim bolestima ovarijuma i bolesnica sa epitelnim ovarijalnim karcinomima). Određena je korelacija OPN-a u grupi ispitivanih bolesnica prema histološkom tipu tumora, stadijumu tumorske bolesti, histološkom i nuklearnom gradusu. Kao cilj rada navedeno je i ispitivanje kliničke efikasnosti OPN testa, njegove specifičnosti, senzitivnosti, pozitivne i negativne prediktivne vrednosti u detekciji benignih i malignih tumora ovarijuma. Određene su i *cut-off* vrednosti koje omogućavaju preciznu trijažu bolesnica sa cistama na jajniku i njihovo adekvatno zbrinjavanje. OPN je upoređen sa još četiri danas najčešće korišćena tumor markera CA125, HE4, CA19.9, CEA i sa ROMA indeksom. Ispitana je njegova prognostička uloga praćenjem bolesnica u periodu od 60 meseci i definisana u odnosu na ishod bolesti.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je ovaj rad urađen na Klinici za Ginekologiju i akušerstvo, KCS i u Centru za medicinsku biohemiju, KCS. Ispitivanje je sprovedeno prema odlukama Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Ispitanice obuhvaćene ovom studijom (n=157) podeljene su u tri grupe, pedantno su uzeti anamnestički i demografski podaci, podaci dobijeni UZ pregledom i izvađeni uzorci krvi za laboratorijska ispitivanja. U serumu ispitanica CMIA tehnikom, određene su osnovne biohemijske analize i tumor markeri, a u plazmi ELISA tehnikom određene su koncentracije OPN. Detaljno je opisana metodologija određivanja OPN-a ELISA testom u plazmi pacijentkinja.

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.

**Zaključak** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Koriš ena **literatura** sadrži spisak od 210 referenci.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Osteopontin kao marker transformacije epitelnih elija i protein ije se koncentracije u plazmi pove avaju 4 do 10 puta u zavisnosti od stadijuma i vrste epitelnog ovarijalnog tumora, može da pruži korisne informacije klini aru o tipu prisutne adneksalne mase. Posle odre ivanja bazalnih nivoa OPN kod zdravih ispitanica, odre ene su vrednosti OPN u grupi bolesnica sa benignim bolestima jajnika i u grupi bolesnica sa epitelnim karcinomima. Statisti ki zna ajna razlika koja je dobijena izme u ispitivanih grupa ukazuje da se OPN može koristiti u predikciji ove bolesti. Pore enjem vrednosti preoperativnog OPN kod bolesnica sa malignim tumorima u odnosu na kontrolnu grupu dobijena je dijagnosti ka korisnost testa (AUC = 0.946), koja ukazuje da bolesnice sa EOC imaju 94,6 puta ve u šansu nego zdrave ispitanice da imaju povišene vrednosti OPN-a. Izborom *cut-off* vrednosti OPNa od 240 $\mu$ g/L, dobijen asenzitivnost testa je 91,2%, a specifi nost 78% što sa ovakvim svojstvima obezbe uje je mogu nost blagovremenog zbrinjavanja bolesnica sa malignim bolestima jajnika. U predikciji benignih formi ovarijalnih tumora OPN testom dobija se niža specifi nost (62,2%) i senzitivnost (88%) i za odabranu *cut-off* vrednost od 110 $\mu$ g/L postoji mogli nost da 37,8% rezultata bude lažno pozitivno. Kako se radi o benignim formama bolesti koja neposredno ne ugrožavaju život ili znatno ne umanjuju kvalitet života prihvatljiva je ova karakteristika markera. Jedan od najvažnijih kriterijuma u ispitivanju performansi tumor markera je njegova sposobnost da odvoji benigne od malignih bolesnica. Dijagnosti ka snaga testa dobijana ROC anlizom za diferencijalnu dijagnostiku bolesnica sa cistama jajnika iznosila je 87,1% (AUC=0,871). Za bolesnice ije su vrednosti OPN iznadgrani nevrednosti od 340  $\mu$ g/L, sasenzitivnoš u od 80,7%, može se tvrditi da je u pitanjuma maligna forma tumora epitelao ovarijuma.

Ovako dobre perfomanse OPN-a kao markera podržava i dokaz da koncentracija OPN-a u krvi korelira sa napretkom bolesti. Rezultatidobijeni u našem radu ukazuju na injenicu da se

na osnovu visine preoperativnog OPN-a, bolesnicemogu svrstati u one kod kojih je bolest u ranoj fazi kada sumogu nostile enjabolje, i one kod kojih je bolest uznapredovala ikada je le enjene izvesnije.

Pore enjem OPN sa tumor marker makoji se danas naj eš ekoriste u klini koj prakizapredikciju ovarijalnih kancera (CA125 i HE4) nijedobijenazna ajnarazlika. Zna i da se primena bilo koga od nabrojenih markera, kao i ROMA indeksa, u dijagnosti koj proceduri može se smatrati jednako pouzdanom.

Udruženim odre ivanjem OPN sa CA125, ilisa HE4 pove ava se dijagnosti kasnaga OPN testa, što govori u prilogo potrebe formiranja markerskih panela u cilju dobijanja boljesenzitivnosti i specifi nosti.

OPN in njegovaklini kaprimenadobijaju dijagnosti koj korisnosti uz laboratorijskenalaze u kojimasu CRP isedimentacija eritrocita istovremeno iznad referentnih vrednosti, kada se OPN može smatrati nezavisnim prognosti kim faktorom.

### C) **Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Mali broj radova ispitivao je zna aj odre ivanja proteina OPN u predikciji ovarijalnih kancera. Mnogo eš e su odre ivane osobine ovog markera kod drugih kancera; prostate, dojke, jetre itd. U jednom od najpoznatijih radova (Kim i saradnici) prvi su opisali osobine OPN-a kao dijagnosti kog biomarkera u detekciji ovarijalnih kancera na više na ina: dokazali su da postoji poja ana ekspresija DNK OPN-gena microarray tehnikom u obolelom tkivu jajnika, RT-PCR tehnikom povišen nivo mRNK OPN-gena u pojedina nim elijskim kulturama kancera jajnika, histohemijskim bojenjem uzoraka tkiva jajnika i potvrdili povezanost nivoa OPN-a u plazmi ELISA testom kod 144 bolesnice sa postojanjem bolesti. Ovi rezultati su u skladu sa našim rezultatima dobijenim primenom istog ELISA testa.

U radu mr Milivojevi je dokazano da nivo OPN u plazmi korelira sa stadijumom tumorske bolesti. U plazmi bolesnicakojesu obuhva ene ovom studijom postoj i statisti kizna ajnarazlika u

nivoima osteopontina kod bolesnicakojesu u ranim, po etnimstadijumimabolesti (FIGO I-II) ionihkojesu u uznapredovalimstadijumimabolesti (FIGO III-IV)  $p < 0,01$ . Sanašim rezultatima slažu se Coppola i saradnici. Oni su u svojim radovima potvrdili da pored povišenog nivoa OPN u tumorskom tkivu postoji i korelacija između nivoa OPN-a i stadijuma tumorske bolesti. Nakae i saradnici, kao i Kim i saradnici su precizirali da se svaki FIGO stadijum može okarakterisati sa odgovarajućom koncentracijom OPN,  $p < 0,05$ , ali su tako e došli do zaključka da povišen nivo OPN ne zavisi od histopatološkog tipa kancera jajnika. Nasuprot ovome Tiniakos i saradnici su mišljenja da ni histološki tip bolesti, ni klinički stadijum nisu u korelaciji sa koncentracijom OPN.

Poznato da OPN inhibira apoptozu i dovodi do aktivacije signalnih puteva u ćelijama koji povećavaju migraciju i adheziju tumorskih ćelija a time i progresiju tumora (Wai i saradnici, Rangaswami i saradnici, Hiss i saradnici). Zato su mnoge studije pokazale značaj ovog markera u praćenju bolesti i u pojavi recidiva (Brakora i saradnici, Nakae i saradnici). Tako e je dokazano da se OPN može primeniti kao neinvazivni skrining test u ranoj dijagnostici jer povišene koncentracije OPN mogu da se odrede u urinu (Ye i saradnici).

Većina autora smatra da senzitivnost koju ima OPN 81,3% (Nakae i saradnici) kada se koristi samostalno, njega je ni slabijim u poređenju sa tumor markerom CA125 u detekciji prisustva ovarijalnih kancera. U rezultatima ovog rada dobijena je identična senzitivnost za OPN, ali je sličan potencijal imao i CA125. Pacijenti sa značajno većim vrednostima nivoa OPN imaju lošiju prognozu i to su dokazali mnogi autori (Bao i saradnici), a to je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu.

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

**1. Milivojević M, Bošković B, Atanacković J, Milićević S, Ražić S, Kastratović Kotlić B.**  
Evaluation of osteopontin and CA125 in detection of epithelial ovarian carcinoma.  
European Journal of gynaecological oncology (EJGO) 2013;1:83-85.

## **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „**Značaj određivanja koncentracije osteopontina u plazmi kao pokazatelja prisustva malignih tumora jajnika**” mr. sci. ph. Mirjane Milivojević predstavlja originalan naučni doprinos u ispitivanju hemokina, fosfolipoproteina osteopontina u detekciji epitelnih tumora jajnika. Ovim kliničkim istraživanjem jasno je dokazana dijagnostička korisnost ovog testa u predikciji benignih i malignih tumora jajnika. Klinički značaj OPN markeru trijaži bolesnica sa ovarijalnim cistama posebno dolazi do izražaja kod mucinoznog histološkog tipa epitelnih ovarijalnih kancera. Udružen sa drugim tumor markerima (CA125 ili HE4) OPN može da popravi njihovu osetljivost i specifičnost i zato ga treba uključiti u multimarkerske panele. OPN je dobar prediktivni marker i najbolju prediktivnu vrednost na ishod bolesti imaju povišene vrednosti OPN-a (>240 µg/L) i FIGO stadijum bolesti. Klinička primena *cut-off* vrednosti OPN-a kao markera maligniteta epitela ovarijuma dobija na dijagnostičkoj korisnosti uz laboratorijski nalaz u kome su CRP i sedimentacija eritrocita istovremeno iznad referentnih vrednosti.

Ova doktorska disertacija urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Tema ovog rada je aktuelna, ciljevi su precizno definisani, metodologija rada je bila savremena, a dobijeni rezultati su pregledno i sistematski prikazani i diskutovani. Izvedeni zaključci su dragoceni jer pružaju smernice za dalja istraživanja ovog i drugih markera. Ista je primena u predikciji ovarijalnih kancera. Karcinom jajnika je najsmrtonosniji ginekološki malignitet, zato su istraživanja posvećena identifikaciji dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera raka jajnika danas vrlo značajna. U eri personalizovane medicine kada se postojeće terapije širokog spektra menjaju individualnim pristupom ka ciljnim molekulama, izbor lekova je povezan sa novim saznanjima o markerima kancera jajnika.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju mr sci ph Mirjane Milivojević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 13.3.2015.

Članovi Komisije:

Prof. dr Lidija Tasi

---

Doc. dr Vesna Dragutinović

---

Prof. dr Vladimir Bošković

---

Mentor

Prof. dr Natraša Petronijević

---

Komentor:

Prof. dr Biljana Kastratović Kotlica

---



