

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 naslovom: „**PROGNOSTI KI ZNA AJ IMUNOHISTOHEMIJSKIH PARAMETARA I HISTOMORFOLOSKOG SKORA U PROCENI TEŽINE DISPLAZIJE EPITELA GRLI A MATERICE**“kandidata mr dr Biserke Vukomanovi ur evi , zaposlene na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu kao lekar specijalista patolog i asistent na katedri za Histologiju i embriologiju. Mentor je Prof. dr Gordana Basta Jovanovi , komentor je Prof. dr Milica Berisavac u penziji.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Darko Ple aš, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Sanja Radojevi Škodri , docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragan Velimirovi , 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 fakulteta slede i

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija mr sci Biserke Vukomanovi ur evi napisana je na 93 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 7 slika, 21 tabela i 18 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skra enica koriš enih u tekstu.

U **uvodu** su jasno definisane patohistološke karakteristike displazije epitela grli a materice, opisan njihov medicinski zna aj i zna aj njihove dijagnostike. Navedeni su patofiziološki procesi nastanka displazije, etiološki faktori i epidemiološke karakteristike ove bolesti. Poseban osvrt je u injen na Humane papiloma viruse (HPV) kao najzna ajniji etiološki faktor bolesti. Opisani su elijski mehanizmi kontrole elijskog ciklusa i apoptoze i uloga tumor supresornih gena. Detaljno su opisani p16, p63, ciklin d1 i survin, njihova uloga u patogenezi displazije radi razumevanja primene ovih imunohistohemijskih markera.

Opisana je morfometrijska analiza, njena uloga i mogućnosti u dijagnostici cervikalne displazije. Također je opisan histomorfološki skor, kao zbirna evaluacija imunohistochemijskih analiza i morfometrijske analize. Dat je pregled literature u vezi dijagnostičkih kriterijuma displazije cerviksa materice uzrokovane HPV infekcijom i njihove dosadašnje primene.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju dijagnostičkih značajki imunohistochemijskih metoda markerima p16, p63, ciklin d1 i survivin u epitelnim displazijama cerviksa materice, nastalim pod uticajem infekcije visokorizicitnim tipovima humanih papiloma virusa, u odnosu na metodu standardne analize biopsijskih uzoraka bojenih Hematoksilin-Eozin (H&E) metodom. Također se sastoji i u ispitivanju značajki histomorfološkog skora displazije epitela cerviksa materice, kod pacijentkinja sa verifikovanim prisustvom visokorizicitnih humanih papiloma virusa reakcijom lančanom polimerizacije, kao zbirno ime imunohistochemijske analize (p16, p63, ciklin d1 i survivin) i morfometrijska analiza, kao pokazatelja biološkog ponašanja u odnosu na metodu standardne analize biopsijskih uzoraka bojenih H&E metodom.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je studija rađena na Institutu za patologiju i sudsku medicinu Vojnomedicinske akademije, a da su ispitanice klinički bile pregledane na Ginekološkom odeljenju Vojnomedicinske akademije u trogodišnjem vremenskom intervalu. Jasno su opisani kriterijumi za ulazak u studiju, kriterijumi za isključenje iz studije i kontrolna grupa. Precizno su navedene dijagnostičke metode sprovedene na pacijentkinjama radi zadovoljavanja kriterijuma za odluku o prvom i ponovljenom biopsiranju. Detaljno je opisana metodologija ispitivanja koja je podrazumevala histopatološku obradu i dijagnostikovanje standardnom H&E metodom, imunohistochemijske metode bojenja p16, p63, ciklin d1 i survivin sa tumačenjem dobijenog nalaza i dodatnim gradiranjem imunoreaktivnosti svetlosnim mikroskopom i određivanje površine jedara morfometrijskom, kompjuterskom metodom sa izražavanjem u numeričkim vrednostima. Također su detaljno objašnjene komponente histomorfološkog skora u prvoj i ponovljenoj biopsiji. Opisane su statističke metode obrade dobijenih podataka.

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. Koriš ena **literatura** sadrži spisak koriš enih referenci.

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

Ovo istraživanje je pokazalo da je najveći i broj pacijentkinja sa displazijom, sa ekspresijom p16 nakon prve biopsije bio u grupi sa displazijom teškog stepena (High-grade squamous intraepithelial lesion-HSIL), a najmanji broj u kontrolnoj grupi bez displazije. Sličan rezultat je bio i nakon ponovljene biopsije, ali sa nešto većim brojem pacijentkinja sa ekspresijom u grupi sa HSIL. Semikvantitativna metoda analize je pokazala da je nakon prve biopsije najveći i broj pacijentkinja bio u grupi sa HSIL i srednje izraženom ekspresijom. Kod ponovljenih biopsija su bili slični rezultati i tako je bio najveći i broj pacijentkinja u toj grupi.

Ova studija je pokazala da je ekspresija p63 nakon prve biopsije kod pacijentkinja sa displazijom, bila najveća u grupi pacijentkinja sa HSIL, a da je najmanji broj pacijentkinja bio u kontrolnoj grupi bez displazije. Nakon ponovljene biopsije broj pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom p63 je bio približan u grupama sa displazijom lakog stepena (Low-grade squamous intraepithelial lesion-LSIL) i displazijom teškog stepena sa nešto većim brojem pacijentkinja u grupi sa LSIL. Semikvantitativna metoda analize nakon prve biopsije pokazala je da je najveći i broj pacijentkinja bio u grupi sa HSIL i blago izraženom ekspresijom p63. Kod ponovljenih biopsija bio najveći i broj pacijentkinja u grupi LSIL i srednjim stepenom ekspresije.

Nalaz ekspresije ciklina d1 nakon prve biopsije je bio sa najvećim brojem pacijentkinja u grupi sa HSIL, a najmanji broj u kontrolnoj grupi bez displazije. Pozitivna ekspresija ciklina d1 je bila podjednaka kod pacijentkinja sa LSIL i HSIL nakon ponovljene biopsije. Semikvantitativna metoda analize je pokazala da je nakon prve biopsije najveći i broj pacijentkinja bio u grupi sa HSIL i blago izraženom ekspresijom. Kod ponovljenih biopsija, najveći i broj pacijentkinja je bio u grupi LSIL i blagim stepenom ekspresije.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je najveći i broj pacijentkinja sa displazijom i sa ekspresijom survivina nakon prve biopsije bio u grupi HSIL, a najmanji broj u kontrolnoj grupi bez displazije. U ponavljanoj biopsiji ekspresija survivina u grupi

pacijentkinja sa HSIL je bila nešto veća u odnosu na grupu sa LSIL. Određena semikvantitativnom metodom, ekspresija survivina u prvoj biopsiji je bila najzastupljenija u grupi sa HSIL i blagom ekspresijom. U ponovljenoj biopsiji to je bila grupa pacijentkinja sa LSIL i blagom ekspresijom.

Morfometrijska analiza je pokazala da je u prvoj biopsiji kod pacijentkinja HSIL, bila više nego dvostruka vrednost ranga površine jedara nego kod pacijentkinja sa LSIL, a više nego deset puta veća vrednost u odnosu na kontrolnu grupu, bez displazije. Sli ni rezultati su dobijeni i nakon ponovljenih biopsija.

Uticaj histomorfološkog skora sa pet nezavisnih promenljivih (p16, p63, ciklin d1, survivin i površina jedara) je bio statistički značajan, šta je pokazalo da model razlikuje ispitanike u pogledu težine displazije i tačno klasifikuje 99% slučajeva. Površina jedra je dala jedinstven statistički značajan doprinos modelu. Kod naših ispitanica je nađeno da porast površine jedra za jednu merenu jedinicu (mikrometar kvadratni) povećava verovatnoću za teži stepen displazije za 1,19 puta.

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

Relativno mali broj radova, vezanih za najsavremeniju patohistološku dijagnostiku displazije epitela grlića materice, je objavljeno u našoj zemlji. Ispitivanje značaja primene više imunohistohemijskih markera pojedinačno i zajedno, kompjuterska morfometrijska analiza i analiza značaja dijagnostičkog skora displazije pokazuje svoju vrednost u Srbiji specijalno kada se zna da je incidenca oboljevanja od karcinoma grlića dvostruko veća u odnosu na Evropski prosek. Osim toga, na našim terenima nisu rađena istraživanja vezana za patohistološku dijagnostiku displazije grlića sa dokazanom infekcijom Humanim papiloma virusima, sa primenom imunohistohemijskih markera p16, p63, ciklin d1, survivin, morfometrijske analize i histomorfološkog skora kod pacijentkinja u ponovljenim biopsijama.

Naša studija je pokazala statistički visoku značajnu razliku u ekspresiji p16 kod pacijentkinja bez displazije epitela grlića, sa LSIL i sa HSIL. Kod ponovljenih biopsija nije postojala statistički značajna razlika u ekspresiji p16 kod HSIL i LSIL. Iako nije veliki broj autora analizirao primenu p16 imunohistohemijskog bojenja u ponovljenim biopsijama, naši rezultati su saglasni sa podacima iz studija u kojima je zaključeno da je

ekspresija p16 vezana za stepen displazije i stepen progresije bolesti (Bose i saradnici 2005, Liao i saradnici 2014.).

Procena značajne semikvantitativne analize ekspresije p16 u cervikalnoj displaziji je rađena od autora sa drugih epidemioloških područja. Naši rezultati analize p16 pokazuju statistički značajnu povezanost ekspresije p16 semikvantitativno analizirane kod pacijentkinja sa displazijom u prvoj i ponovljenoj biopsiji slično rezultatima nekih autora (Lesnikova i saradnici 2009.).

Ekspresija p63 nakon prve biopsije je bila sa statistički visokom značajnom razlikom kod kontrolne grupe, pacijentkinja sa LSIL i HSIL za razliku od ekspresije kod ponovljene biopsije gde nije postojala statistički značajna razlika između grupa LSIL i HSIL. Iako nema mnogo studija u kojima je ekspresija p63 analizirana u ponovljenim biopsijama, naši rezultati su generalno slični rezultatima nekih autora (Gailley i saradnici 2013, Vasilescu i saradnici 2009.).

Slični rezultati nakon prve biopsije su pokazani semikvantitativnom analizom ekspresije p63 sa statistički značajnom razlikom između pacijentkinja sve tri grupe; bez statistički značajne razlike semikvantitativno analizirane ekspresije p63 između pacijentkinja dve grupe (HSIL i LSIL) nakon ponovljene biopsije. Naša studija je imala u značajnoj meri slične rezultate kao u objavljenim radovima (Houghton i saradnici 2009, Nekulova i saradnici 2013).

Analizirajući ekspresiju ciklina d1 nakon prve biopsije pokazano je da je bila sa statistički značajnom razlikom kod kontrolne grupe, pacijentkinja sa LSIL i HSIL; što nije bilo slučaj kod ekspresije u ponovljenoj biopsiji gde nije postojala statistički značajna razlika između grupa LSIL i HSIL. U nešto većem broju studija je analizirana povezanost ciklina d1 sa karcinomom grlića u odnosu na analizu njegove ekspresije u displazijama. Međutim, povezanost ekspresije ovog imunohistohemijskog markera i cervikalne displazije je kod nekih autora slična našim nalazima (Carreras i saradnici 2007, Das i saradnici 2011).

Semikvantitativna analiza ekspresije ciklina d1 nakon prve biopsije je pokazala statistički značajnu razliku između pacijentkinja sve tri grupe; nije bilo statistički značajne razlike semikvantitativno analizirane ekspresije ciklina d1 između pacijentkinja

dve grupe (HSIL i LSIL) nakon ponovljene biopsije. Nasa studija je imala, u značajnoj meri, slične rezultate sa studijama drugih autora uz sva ograničenja laboratorije.

Ekspresija survivina nakon prve biopsije je bila sa statistički visokom značajnom razlikom kod kontrolne grupe, pacijentkinja sa LSIL i HSIL, za razliku od ispoljene ekspresije kod ponovljene biopsije gde nije postojala statistički značajna razlika između grupa LSIL i HSIL. Analiza ekspresije survivina u cervikalnoj displaziji je kod najvećeg broja objavljenih radova vršena bez analize prve biopsije pacijentkinja, odnosno isključivo nakon prvog biopsiranja. Generalno gledano naši rezultati su kompatibilni sa opažanjima u okviru tih studija. Ovo se odnosi i na semikvantitativnu analizu, gde ni nakon prvog niti ponovljenog biopsiranja nije pokazana statistički značajna razlika u grupama poređenja (Barbosa i saradnici 2011).

Postojala je statistički visoka značajna razlika u površini jedara displastičnih ćelija grlišta analiziranih morfometrijskom metodom između ispitivanih grupa kako u prvoj, tako i u ponovljenoj biopsiji. Iako nije objavljen veliki broj radova sa ovom analizom, naši rezultati su saglasni činjenici da je veličina jedra osnovni parametar za zadovoljenje kriterijuma dijagnoze displazije i rangiranje njenog stepena (Hwang i saradnici 2012.).

Rezultati studije u proceni značaja i uticaja histomorfološkog skora sa pet nezavisnih promenljivih (p16, p63, ciklin d1, survivin i površina jedra) pokazuju statistički značajan rezultat, sa ovom klasifikacijom 99% slučajeva i sa količinom verovatnoće 1,19 šta ukazuje da pacijentkinje sa površinom jedra većom za jednu meru jedinicu imaju 1,19 puta veću verovatnoću za teži oblik displazije. Nisu objavljeni radovi na našim terenima sa zbirnom analizom svih parametara opisanog histomorfološkog skora kod displazija uzrokovanih HPV infekcijom. Analiziraju i druge studije i njihove rezultate analize pojedinačnih dijagnostičkih metoda (kao i manji broj udruženih) koje su pokazivale značajnost u dijagnostici ovih displazija i koreliraju ih sa našim rezultatima, utvrđujući značajan stepen sličnosti generalnih smernica sa našim rezultatima. (Razmpoosh i saradnici 2014, Romus i saradnici 2013, Waxman i saradnici 2012).

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

1. Vukomanović - urđević B. et al. Significance of survivin immunoreactivity and morphometric analysis of HPV-induced cervical dysplasia. Arch.biol.sci.2014.66(1)429-436.

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

Doktorska disertacija “**Prognostički značaj imunohistohemijskih parametara i histomorfološkog skora u proceni težine displazije epitela grlišta i materice**” dr Biserke Vukomanović predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju metodologije savremene dijagnostike displazija epitela grlišta i materice, uzrokovanih humanim papiloma virusima. Ovim istraživanjem je pokazana pojedinačna i zbirna efikasnost upotrebe imunohistohemijskih markera p16, p63, ciklin d1 i survivina, morfolometrijske kompjuterske metode i njihovog zajedničkog histomorfološkog skora u dijagnostici cervikalnih displazija. Upotreba ovih metoda poboljšava preciznost dijagnostike, a samim tim i efikasnost trijaže pacijentkinja kako kod prve, tako i kod ponovljene biopsije. Rezultati ove doktorske disertacije bi mogli da pomognu u dodatnoj objektivizaciji patohistološke dijagnostike displazije uzrokovane infekcijom Humanim papiloma virusima sa konkretizacijom informacija bitnih za kliničku lečenje i dinamiku praćenja pacijentkinja.

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 vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Biserke Vukomanović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 08.02.2015.

Mentor: Prof. dr Gordana Basta Jovanović

Komentor: Prof. dr Milica Berisavac

Članovi Komisije:

Prof. dr Darko Plešić

Doc. dr Sanja Radojević Škodrić

Prof. dr Dragan Velimirović

