

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

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

„Povezanost ekspresije PTEN proteina i prognoze bolesti kod žena obolelih od ranog karcinoma dojke lečenih ovarijalnom ablacijom“

kandidata dr Tamare Ursulović, zaposlene u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu. Mentor je Prof. dr Vesna Plešinac Karapandžić. Komentor je N.Sar. dr Snežana Šušnjar.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Svetislav Tatić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. Dr Ivan Marković, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. N.Sav. dr Mirjana Branković Magić, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

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 Tamare Ursulović napisana je na ukupno 93 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 31 tabela i 11 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je definisano šta je to rani karcinom dojke. Navedena je epidemiologija karcinoma dojke i prikazana je podela na stadijume bolesti. Opisano je hirurško lečenje ranog karcinoma dojke pošteđenim i radikalnim operacijama kao i indikacije, ciljevi i principi postoperativne radioterapije karcinoma dojke.

Na adekvatan način je u potpunosti opisano aktuelno adjuvantno sistemsko lečenje hemioterapijom, hormonoterapijom i biološkom terapijom ranog karcinoma dojke,

uključujući: indikacije, mehanizam dejstva, dužinu primene i neželjena dejstva svakog vida navedenog adjuvantnog lečenja. Izneti su biološki podtipovi karcinoma dojke i pojam hormon receptor pozitivnog karcinoma dojke. Pored tradicionalno korišćenih prognostičkih i prediktivnih faktora u karcinomu dojke jasno je apostrofirano značaj ispitivanja i novih potencijalnih faktora prognoze kao što je ekspresija PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog*) proteina. Takode je prikazan detaljan osvrt na dosadašnja saznanja o značaju ekspresije PTEN proteina u hormon receptor pozitivnom karcinomu dojke.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od procene uticaja ekspresije PTEN proteina na preživljavanje bez bolesti (eng. *disease free survival, DFS*), na ukupno preživljavanje (eng. *overall survival, OS*) i na preživljavanje specifično za karcinom dojke (eng. *breast cancer specific survival, BCSS*).

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o prospektivnoj analizi praćenja uticaja retrospektivno određene ekspresije PTEN proteina na ishod bolesti analizirane grupe pacijentkinja sa karcinomom dojke. Istraživanje je sprovedeno u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Detaljno su opisani kriterijumi uključivanja u istraživanje i modaliteti lečenja pacijentkinja. Takodje, detaljno je opisana metoda za određivanje koncentracije receptora za estrogen i progesteron klasičnom biohemijskom metodom i nedvosmisleno su definisane vrednosti ovih receptora koje se smatraju pozitivnim od. negativnim. Zatim je opisana metoda za određivanje c-erb-B2 gena CISH metodom i definisane su grupe sa HER2 pozitivnim i HER2 negativnim statusom bolesti. I na kraju su date metode za određivanje ekspresije PTEN proteina imunohistohemijskom metodom i definisan je PTEN+ i PTEN- status pacijentkinja. Precizno su definisani parametri na osnovu kojih su se procenjivali ishodi bolesti (eng. *time to event*): DFS, OS i BCSS. Ovo istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom i načelima Etičkog komiteta Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta 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 168 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Relaps bolesti zabeležen je kod 37/66 (56%) pacijentkinja. Najčešće je bilo udaljenih metastaza (45,45%), od toga najviše koštanih lezija (24,24%). Kod pacijentkinja sa PTEN negativnim tumorima zabeležena je značajno veća stopa relapsa bolesti u odnosu na pacijentkinje sa PTEN pozitivnim tumorima.

Medijana DFS za celu ispitivanu grupu iznosila je 15,6 godina sa odgovarajućim 95% intervalom poverenja (95%CI) koji je iznosio $\geq 10,5$ godina. Nakon 15 godina praćenja medijana DFS nije dostignuta. Na kraju praćenja (29 godina) kumulativna DFS je iznosila 58,8% a gornja granica odgovarajućeg 95%CI od 75% je ukazivala na mogućnost da kod ovakvih pacijentkinja medijana DFS neće biti dostignuta ni u 29. godini. Pacijentkinje sa PTEN negativnim tumorima imaju značajno kraće DFS u odnosu na pacijentkinje sa PTEN pozitivnim tumorima. Petogodišnje i desetogodišnje stope DFS su za 47% odnosno za 60% veće u PTEN pozitivnoj u poredjenju sa PTEN negativnom podgrupom pacijentkinja. Od 15. godine prate se samo PTEN pozitivne pacijentkinje, s obzirom na to da su sve pacijentkinje u PTEN negativnoj podgrupi imale relaps bolesti. Na kraju praćenja (29 god) kumulativni procenat DFS kod bolesnica sa PTEN pozitivnom ekspresijom proteina iznosi 58,8%, a gornja granica odgovarajućeg 95% intervala poverenja iznosi 75,0% što ukazuje na mogućnost da kod ovakvih pacijentkinja medijana DFS ne bude dostignuta ni u 29. godini.

Smrtni ishod zabeležen je kod 51,52% pacijentkinja. Dobijena je medijana OS od 23 godine za celu ispitivanu grupu (95% CI $\geq 14,2$ godine). Nakon 20 godina praćenja, medijana OS nije dostignuta. Kumulativni % OS u 25-toj godini i na kraju praćenja (29. godina) je isti, 45,1% , ukazujući na mogućnost da medijana OS ne bude dostignuta ni u 29.godini. U PTEN negativnoj podgrupi smrtni ishod je zabeležen u značajno većem broju pacijentkinja u poredjenju sa PTEN pozitivnom podgrupom. Petogodišnje i desetogodišnje stope OS su za 34,7% odnosno za 78% veće u PTEN pozitivnoj u poredjenju sa PTEN negativnom podgrupom pacijentkinja. Od 15. godine prate se samo PTEN pozitivne pacijentkinje, s obzirom na to da su sve pacijentkinje u PTEN negativnoj podgrupi preminule. Na kraju praćenja (29 godina) kumulativni procenat OS kod bolesnica sa PTEN pozitivnom ekspresijom proteina iznosi 61% a gornja granica odgovarajućeg 95% intervala poverenja iznosi 77,7% što ukazuje na mogućnost da medijana OS ne bude dostignuta ni u 29.godini.

Zbog KD je umrlo 32/46 (48,48%) od ukupno umrlih 34 pacijentkinja, dok su 2 pacijentkinje od ukupno umrlih preminule zbog pridruženih bolesti. Medijana BCSS je iste vrednosti kao kod OS. BCSS je bilo značajno kraće u PTEN negativnoj podgrupi

pacijentkinja u poredjenju sa PTEN pozitivnom podgrupom. Petogodišnje i desetogodišnje stope BCSS su za 34,6% odnosno za 77,7% veće u PTEN pozitivnoj u poredjenju sa PTEN negativnom podgrupom pacijentkinja. Od 15. godine se prate samo PTEN pozitivne pacijentkinje, s obzirom na to da su sve pacijentkinje u PTEN negativnoj podgrupi preminule od raka dojke.

Cox-ova regresiona analiza za DFS i OS je uradjena nad grupom od 66 a za BCSS nad grupom od 64 pacijentkinja za faktore: starost, T status, N status, sadržaj ER, fenotip ER/PgR, ekspresija PTEN proteina i HER2 status. Od svih ispitivanih faktora Cox-ove regresione analize za DFS, statistička značajnost je potvrđena samo za kategoriju ekspresija PTEN proteina (pacijenti bez ekspresije PTEN proteina imaju 8,6 puta veći rizik za relaps bolesti u odnosu na pacijentkinje sa prisutnom ekspresijom ovog proteina). Od svih ispitivanih faktora Cox-ove regresione analize za OS statistička značajnost potvrđena je samo za kategorije ER/PgR fenotipa (pacijentkinje sa ER+/PgR+ fenotipom imaju 2,26 puta veći rizik od smrtnog ishoda u odnosu na pacijentkinje sa ER+/PgR-&ER-/PgR+ fenotipom), ekspresije PTEN proteina (pacijentkinje bez ekspresije PTEN imaju 17,23 puta veći rizik od smrtnog ishoda u odnosu na pacijentkinje sa PTEN pozitivnom ekspresijom) i T statusa (pacijentkinje sa tumorima većim od 5cm, T3 tumorima, imaju 4,19 puta veći rizik od smrtnog ishoda u odnosu na pacijentkinje sa tumorima manjim od 5cm, od. T1 + T2 tumorima). Od svih ispitivanih faktora Cox-ove regresione analize za BCSS statistička značajnost potvrđena je za kategoriju T status u TNM (pacijentkinje sa tumorima većim od 5cm imaju 4,16 puta veći rizik od smrtnog ishoda od raka dojke u odnosu na pacijentkinje sa tumorima manjim od 5cm) i za ekspresiju PTEN proteina (pacijentkinje bez ekspresije PTEN proteina imaju 17,6 puta veći rizik od smrtnog ishoda zbog raka dojke u odnosu na pacijentkinje sa prisutnom ekspresijom ovog proteina).

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Prema ekspresiji PTEN proteina naša ispitivana grupa pacijentkinja podeljena je na podgrupu bez ekspresije PTEN proteina (PTEN negativna) i na podgrupu sa prisutnom ekspresijom PTEN proteina (PTEN pozitivna). Verifikovali smo 29% pacijentkinja bez ekspresije PTEN proteina. U prethodnom istraživanju u Institutu za onkoogiju i radiologiju Srbije, sprovedenom u grupi pacijentkinja sa ranim karcinomima dojke, koje su imale identične faktore rizika kao naša grupa ispitanica, osim što su sve bile postmenopauzne i lečene su samo adjuvantnom primenom tamoksifena, pokazano da je gubitak ekspresije PTEN proteina

bio zabeležen kod 32% pacijentkinja (Milovanović i sar, 2011). Naši rezultati se uklapaju sa podacima iz literature da je odsustvo PTEN ekspresije zabeleženo u 28%-48% pacijentkinja sa karcinomima dojke (Shoman i sar, 2005; Miller i sar 2009; Saal i sar, 2007; Depowski i sar, 2001). Gubitak heterozigotnosti PTEN gena (eng. *Loss of heterozygosity – LOH*) jedan je od najčešćih uzroka gubitka PTEN aktivnosti i prisutan je u 30% do 40% karcinoma dojke dok su mutacije PTEN gena prisutne u 5% do 12% sporadičnih karcinoma dojke. Mi nismo radili ispitivanja aktivnosti PTEN-a na genskom nivou da bismo mogli da poredimo rezultate sa literaturnim.

U našoj grupi pacijentkinja, najviše je bilo udaljenih metastaza, od toga najviše koštanih lezija što je u skladu sa literaturnim podacima da luminalni karcinomi dojke najčešće metastaziraju u koštani sistem. Kod pacijentkinja sa PTEN negativnim tumorima zabeležena je značajno veća stopa relapsa bolesti u odnosu na pacijentkinje sa PTEN pozitivnim tumorima. Petogodišnje i desetogodišnje stope DFS su za 47% odnosno za 60% veće u PTEN pozitivnoj u poredjenju sa PTEN negativnom podgrupom pacijentkinja.

Milovanović i saradnici su takođe pokazali da je odsustvo ekspresije PTEN proteina povezano sa značajno kraćim DFS i OS kod postmenopauzних pacijentkinja sa HR pozitivnim karcinomima dojke koje su lečene samo adjuvantnom primenom Tamoksifena (ova grupa pacijentkinja imala je sve faktore rizika jednake kao naša ispitivana grupa pacijentkinja sa rakom dojke, samo su one bile postmenopauzne i lečene su adjuvantnom primenom tamoksifena, bez adjuvantne hemioterapije). Tako je medijana preživljavanja bez znakova bolesti kod pacijentkinja bez ekspresije PTEN proteina, u zavisnosti od toga da li se radi o duktalnom ili lobularnom karcinomu, kreće od 43,5- 46 meseci što je slično našem rezultatu od 44 meseca. I u ovoj grupi PTEN pozitivne pacijentkinje imaju značajno duže medijane DFS, kod duktalnih karcinoma 206 meseci a kod lobularnih ona još nije dostignuta.

Naši rezultati takođe koreliraju sa nalazima koje su publikovali Shoman i saradnici (Shoman i sar, 2005). I oni su dobili značajnu povezanost izmedju redukovane PTEN ekspresije, kraćeg DFS i kraćeg BCSS kod pacijentkinja sa HR pozitivnim karcinomima dojke koje su lečene Tamoksifenom.

Takođe, naši rezultati koreliraju sa ranim radovima koji su pokazali da bolesnice sa karcinomima dojke sa redukovanom ekspresijom PTEN proteina imaju goru prognozu bolesti u odnosu na one sa normalnom ekspresijom proteina, ali multivarijantna analiza nije potvrdila da ekspresija PTEN proteina predstavlja nezavisni faktor prognoze (Saal i sar., 2007; Rstusuz

S i sar, 2005). Winter i saradnici takodje dolaze do sličnih rezultata, tj.oni su u grupi od 146 pacijentkinja sa duktalnim invazivnim karcinomima dojke pokazali da je DFS bio duži ukoliko je PTEN protein bio eksprimiran u tumorskim ćelijama dojke (Winter i sar, 2007).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Tamara Ursulovic, Zorka Milovanovic, Natasa Medic Milijić, Dusica Gavrilovic, Vesna Plesinac-Karapandzić, Snezana Susnjar. The influence of PTEN protein expression on disease outcome in premenopausal hormone receptor-positive early breast cancer patients treated with adjuvant ovarian ablation: a long term follow-up. J BUON 2018.; 23(4).

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Povezanost ekspresije PTEN proteina i prognoze bolesti kod žena obolelih od ranog karcinoma dojke lečnih ovarijalnom ablacijom“ dr Tamare Ursulović, predstavlja originalni naučni doprinos u daljem razumevanju bioloških osnova karcinoma dojke. Ovo istraživanje je nastavak prethodnog istraživanja u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, koje je pokazalo da ekspresija PTEN proteina može imati prognostički značaj kod postmenopauzних HR pozitivnih ranih karcinoma dojke lečenih adjuvantom hormonskom terapijom Tamoksifenom. I u našem istraživanju, naučni doprinos je u dobijanju novih odgovora o značaju ekspresije PTEN proteina kao faktora prognoze kod ranog karcinoma dojke na ishod bolesti iskazan kao preživljavanje bez bolesti i ukupno preživljavanje. Klinička korist svih pa i ovog biomarkera bi bila ako poznavanje PTEN statusa promoviše promene u lečenju u rutinskoj kliničkoj praksi ili koje produžava preživljavanje naših pacijentkinja.To bi značilo da se na osnovu ekspresije PTEN proteina možda može odvojiti podgrupa sa lošom prognozom koja bi zahtevala dodatno lečenje, od podgrupe pacijentkinja sa dobrom prognozom koja ne bi morala biti izložena dodatnoj, potencijalno toksičnoj terapiji.

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 Tamare Ursulović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 27.04.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Svetislav Tatić

Doc. Dr Ivan Marković

N.Sav. dr Mirjana Branković Magić,

Mentor:

Prof.dr Vesna Plešinac Karapandžić

Komentor

N.Sar.dr Snežana Šušnjar
