

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 20.05.2021. godine, broj 9700/14-AB, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Prognostički značaj biomarkera epitelno-mezenhimalne tranzicije kod metastatskog kolorektalnog karcinoma u jetri“

kandidata dr Aleksandra Bogdanovića, zaposlenog u Klinici za digestivnu hirurgiju – Prva hirurška, Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentor je akademik prof. dr Zoran Krivokapić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Vladimir Dugalić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Akademik prof. dr Predrag Peško, SANU
3. Doc. dr Danijel Galun, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. Dr Aleksandra Nikolić, viši naučni saradnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu
5. Prof. dr Goran Stanojević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

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 Aleksandra Bogdanovića napisana je na ukupno 104 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 16 tabela, 48 grafikona i 7 slika. Doktorska disertacija sadrži podatke o mentoru i komisiji, sažetak na srpskom i engleskom jeziku, spisak skraćenica korišćenih u tekstu i biografiju kandidata.

Uvod doktorske disertacije je podeljen u tri celine: kolorektalni karcinom, metastaze kolorektalnog karcinoma u jetri i epitelno-mezenhimalna tranzicija.

U prvom delu uvoda o kolorektalnom karcinomu prikazani su i ilustrovani incidenca i smrtnost od kolorektalnog karcinoma u svetu kao i trend promene broja novoobolelih i umrlih u budućnosti, u zavisnosti od geografskih regija. Na osnovu podataka Internacionalne agencije za istraživanje raka za 2018. godinu, prikazana je geografska distribucija oboljevanja i umiranja od kolorektalnog karcinoma u različitim delovima sveta, polna i starosna distribucija i faktori rizika za pojavu kolorektalnog karcinoma. Navedeni su podaci o oboljevanju i smrtnosti od kolorektalnog karcinoma u Srbiji za 2018. godinu prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, a na osnovu Registra za karcinome u centralnoj Srbiji. Koristeći podatke Američkog udruženja za kancer, objašnjena je prognoza kolorektalnog karcinoma u zavisnosti od stadijuma bolesti u trenutku dijagnoze. Objašnjena je molekularna patogeneza i podela kolorektalnog karcinoma na sporadičnu, familijalnu i hereditarnu formu. Detaljno su pojašnjeni faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma. Opisana je detaljno japanska klasifikacija i TNM klasifikacija bolesti sa tabelarnim prikazom TNM stadijuma bolesti.

U odeljku o metastazama kolorektalnog karcinoma u jetri prikazana su savremena shvatanja o funkcionalnoj anatomiji jetre, učestalost pojave metastaza u jetri kod bolesnika sa primarnim kolorektalnim karcinomom kao i njihova polna i starosna distribucija. Opisana je molekularna i ćelijska osnova metastaziranja u jetri. Dokumentovani su prognostički kliničko-patološki parametri, prognostički modeli i skorovi i markeri predikcije odgovora na primenjenu terapiju. U poslednjem odeljku o metastazama u jetri detaljno su prikazani savremeni principi lečenja metastaza kroz multidisciplinarni pristup, primenom različitih terapijskih modaliteta. Jasno je objašnjeno lečenje hirurški resektabilnih, potencijalno resektabilnih i nerektabilnih metastaza u jetri.

Nakon prikaza osnovnih karakteristika procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije u procesu karcinogeneze, detaljno su opisane i ilustrovane specifičnosti procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije u karcinogenezi primarnog kolorektalnog karcinoma i u procesu metastaziranja malignih ćelija u jetri. Marker i zastupljeni u procesu aktivacije epitelno-mezenhimalne tranzicije i efektni molekuli su grupisani u zavisnosti od subcelularnog nivoa aktivacije i delovanja.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani. Osnovni cilj je bio utvrditi prognostički značaj biomarkera epitelno-mezenhimalne tranzicije za pojavu ranog recidiva bolesti nakon resekcije jetre zbog metastatskog kolorektalnog karcinoma. Kao ciljevi istraživanja su definisani i procena prognostičkog značaja kliničkih i patohistoloških parametara za pojavu ranog recidiva bolesti nakon resekcije jetre.

U poglavlju **materijal i metode** je opisan dizajn studije: vrsta naučnog istraživanja, vreme i mesto ispitivanja, kriterijumi za uključivanje i isključivanje bolesnika. Sprovedena je prospektivna, delom retrospektivna kohortna studija u Klinici za digestivnu hirurgiju – Prva hirurška, Klinički centar Srbije, Beograd, u periodu od 01. decembra 2016. do 20. februara 2020. godine. Studija je odobrena od Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Studijsku populaciju su činili bolesnici lečeni potencijalno radikalnom resekcijom jetre zbog metastaza kolorektalnog karcinoma u jetri. Svi bolesnici su dali informisani pristanak pre uključjenja u studiju.

Unapred su definisani demografski, klinički, patohistološki i genetički parametri koji su registrovani u toku istraživanja. Opisan je način uzorkovanja biološkog materijala, skladištenje i genetička analiza.

Bolesnici su praćeni godinu dana nakon resekcije jetre. Događaj od interesa je bio recidiv bolesti nakon godinu dana od operacije.

Urađena je deskriptivna i analitička statistika. ROC (*engl.* Receiver operating characteristic) kriva je kreirana za vrednosti ekspresije *CDHI*, *FNI* and *VIM* u metastatskom tkivu i serumu. Primenom Judenovog indeksa određene su kritične vrednosti (*engl.* cut-off) ekspresije gena. Na osnovu kritičnih vrednosti, bolesnici su podeljeni u dve grupe sa niskom i visokom ekspresijom. Jednogodišnja verovatnoća preživljavanja je utvrđena Kaplan-Majerovom metodom a poređena je primenom Log-rank testa. Prognostički značaj je analiziran primenom Cox regresionog modela.

Rezultati su opisani tekstualno i ilustrovani grafikonima i tabelama.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz rezultata i podataka drugih istraživanja iz literature sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci su izvedeni na osnovu rezultata istraživanja i jasno su definisani u odnosu na postavljene ciljeve istraživanja.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 117 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i izveštaja iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije, utvrđeno je da podudaranje teksta (*engl.* Similarity index) iznosi 17%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je tzv. opštih mesta, podataka, naziva i ličnih imena, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika. Na osnovu navedenog, doktorska disertacija se može smatrati originalnom.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Istraživanje je obohvatilo 30 bolesnika sa metastazama kolorektalnog karcinoma u jetri kod kojih je urađena resekcija jetre. Muški pol je bio zastupljeniji (53,3%) a najčešća starosna populacija je bila između 60 i 69 godina.

Većina bolesnika je imala uznapredovali stadijum primarnog karcinoma. Lokalni T3 i T4 stadijum bolesti je imalo 97% a pozitivan limfonodalni staus (N+) je bio prisutan kod 73% ispitanika. Limfatična i vaskularna invazija je bila prisutna kod više od polovine ispitanika a perineuralna kod 47%.

Metastaze u jetri su bile prisutne u trenutku dijagnoze primarnog karcinoma (sinhrone metastaze) kod 73% bolesnika (Dukes D stadijum). Kod 40% bolesnika je detektovana jedna (solitarna) metastaza dok su ostali imali multiple promene u jetri. Multiple metastaze su bile češće kod sinhrone prezentacije bolesti. Promer metastaza je bio u rasponu od 15-100 mm. Bolesnici sa sinhronim metastazama su češće primili preoperativnu hemioterapiju i imali bilobarnu distribuciju tumora u jetri, što ukazuje da je sinhrona prezentacija bolesti znak uznapredovalog metastatskog stadijuma. Preoperativnu hemioterapiju je primilo 50% bolesnika. Najzastupljeniji terapijski dublet je bio Oksaliplatin i Bevacizumab. Kompletna regresija nakon primenjene hemioterapije nije registrovana. Dvoje od 15 bolesnika je imalo progresiju bolesti na prvu liniju hemioetarpije.

Ekspresija *CDHI*, *FNI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre je određena kod 25 (83.3%), 24 (80%) i 29 (96.7%) bolesnika, respektivno. Prosečna vrednost ΔCt u malignom metastatskom tkivu za *CDHI*, *FNI* i *VIM* je bila -2.28, -0.79 i -1.52, respektivno.

Ekspresija *CDHI*, *FNI* i *VIM* u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu je određena kod 27 (90%), 29 (96.7%) i 29 (96.7%), respektivno. Prosečna vrednosti ΔCt u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu za *CDHI*, *FNI* i *VIM* je bila -2.64, 2.75 i -0,8, respektivno.

Ekspresija *CDHI* i *VIM* u serumu je određena kod 20 (66.7%) i 28 (93.3%) bolesnika, respektivno. Ekspresija *FNI* u serumu nije detektovana ni kod jednog bolesnika.

Prosečna ekspresija *FNI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu je manja od ekspresije u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu, dok razlika u ekspresiji *CDHI* nije utvrđena.

Na osnovu odnosa ekspresije u malignom metastatskom tkivu i netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu, bolesnici su podeljeni u dve grupe sa sniženom i povišenom ekspresijom *CDHI*, *FNI* i *VIM*. Bolesnici sa povišenom *CDHI* ekspresijom su češće imali multiple metastaze, bilobarnu distribuciju tumora i češće su primali preoperativnu hemioterapiju.

Nije pokazana značajna korelacija ekspresija *CDHI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre i serumu. Preoperativne vrednosti tumorskih markera CEA i CA 19-9 ne koreliraju sa ekspresijom *CDHI*, *FNI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre.

Od 15 bolesnika koji su primili preoperativnu hemioterapiju, sedam je imalo parcijalnu regresiju metastaza, šest je imalo stabilnu bolest a kod dvoje je registrovana progresija bolesti. Ekspresija *CDHI* u malignom metastatskom tkivu je bila veća kod bolesnika koji su primili preoperativnu hemioterapiju. Nivo ekspresije *CDHI* u malignom metastatskom tkivu se takođe razlikuje kod bolesnika sa različitim odgovorom na hemioetrapiju. Primećen je trend ka nižim ekspresijama kod boljeg terapijskog odgovora.

Primenom uzoračkih vrednosti ekspresija u različitim tkivima, određena je granična (cutoff) vrednost na osnovu koje su bolesnici podeljeni u dve grupe sa niskom i visokom ekspresijom.

Recidiv bolesti je detektovan kod 47% bolesnika nakon 12 meseci. Veća ekspresiju *CDHI* u malignom metastatskom tkivu je registrovana kod bolesnika bez ranog recidiva bolesti. Bolesnici sa visokom ekspresijom *CDHI* u malignom metastatskom tkivu jetre su imali duže jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti dok je *VIM* ekspresija u serumu bila viša kod bolesnika sa dužim jednogodišnjem reživljavanjem bez recidiva bolesti.

Nivo ekspresije *CDHI* u malignom metastatskom tkivu jetre je jedini nezavisni prediktor ranog recidiva bolesti pri multivarijantnoj analizi.

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Istraživanje je obuhvatilo bolesnike sa metastatskim kolorektalnim karcinomom (stadijum IV) kojima su metastaze u jetri detektovane u trenutku dijagnoze primarnog kolorektalnog karcinoma ili kasnije, nakon resekcije primarnog tumora. Medicinski i socijalni značaj kolorektalnog karcinoma je prikazan u uvodnom delu prezentacijom epidemioloških podataka koji su preuzeti iz Internacionalne agencije za istraživanje raka (poslednji presek stanja iz 2018. godine). Stopa incidence kolorektalnog karcinoma je i dalje visoka u razvijenim delovima sveta ali je trend porasta incidence zaustavljen poslednjih godina (Arnold M 2017). U zemljama u razvoju, incidenca je i dalje u značajnom porastu zbog prihvatanja stila života (Mattiuzzi C 2019). Zahvaljujući razvijenom skrining programu, bogate zemlje zapada konstantno smanjuju smrtnost od kolorektalnog karcinoma, dok se lečenje u manje razvijenim zemljama sveta i dalje otpočinje u uznapređovalom stadijumu bolesti. Podaci iz istraživanja koji govore o zastupljenosti uznapređovalog stadijuma primarnog karcinoma ali i metastatske bolesti u jetri kod studijskih ispitanika, podudaraju se sa globalnim izveštajima o oboljevanju i smrtnosti od kolorektalnog karcinoma i donekle objašnjavaju visoku stopu smrtnosti u Srbiji.

Za studiju je odabran panel od tri gena *CDHI*, *FNI* i *VIM* na osnovu rezultata prethodnih istraživanja koja su jasno pokazala izmenjenu proteinsku ekspresiju kod bolesnika sa kolorektalnim karcinomom (Palaghia M 2016, Yi W 2016. i Du L 2018). Analiza ekspresije gena *CDHI*, *FNI* i *VIM* u različitim tkivima je urađena primenom qRT-PCR metoda. Pojedini naučni izveštaji prikazuju prognostički potencijal analizom proteinske ekspresije koja se u tkivu utvrđuje metodom imunohistohemije a u serumu ELISA testom. Suprotno od toga, u doktorskoj disertaciji je analizirana ekspresija gena *CDHI*, *FNI* i *VIM* detekcijom

tkivnih i slobodno cirkulišućih nukleinskih kiselina u serumu, konkretno informacione RNK (iRNK).

Specifičnost doktorske disertacije u odnosu na druga naučna istraživanja dostupna u literaturi je dvostruka. Većina studija koje su analizirale prognostički i prediktivni karakter biomarkera epitelno-mezenhimalne tranzicije su analizirale tkivo primarnog karcinoma i bolesnike sa ranijim stadijumima bolesti (Qu J, 2017; Foda AA, 2015). U doktorskoj disertaciji je analiziran prognostički značaj ekspresije u malignom metastatskom tkivu i serumu bolesnika sa metastazama karcinoma u jetri (stadijum IV bolesti). Takođe, za razliku od literaturnih podataka, doktorska disertacija je obradila nivo slobodnih cirkulišućih i tkivnih iRNK za *CDHI*, *FNI* i *VIM* kod metastatskog kolorektalnog karcinoma u jetri. Većina autora je određivala nivo proteinske ekspresije korespondirajućih gena. Nakashima i saradnici su analizirali ekspresiju E-kaderina imunohistohemijskom metodom u metastatskom tkivu jetre i utvrdili povezanost ekspresije E-kaderina i preživljavanja bez recidiva bolesti. Juric P i saradnici su analizirali ekspresiju E-kaderina u primarnom karcinomu, limfogenim metastazama i hematogenim metastazama u jetri ali nivo ekspresije je ukupno preživljavanje bilo nezavisno od nivoa ekspresije E-kaderina.

Jedan od rezultata studije je ukazao na različiti nivo ekspresije *CDHI* u malignom metastatskom tkivu jetre kod bolesnika koji su ispolji različit odgovor na preoperativnu hemioterapiju. Iz toga prizilazi zaključak da ekspresija *CDHI* u malignom metastatskom tkivu može poslužiti kao prediktivni marker hemosenzitivnosti. Ovaj rezultat može poslužiti kao osnova za dalja bazična *in vitro* i *in vivo* istraživanja hemosenzitivnosti kolorektalnog karcinoma. Prethodno su Druzhkova i saradnici dokazali hemorezistentnost E-kaderin pozitivnih ćelijskih linija adenokarcinoma kolona i ćelijskih kultura iz kolorektalnog karcinoma na 5-FU, Oksaliplatin i Irinotekan. Geissler i saradnici su pokazali da je E-kaderin potencijalno novi prediktivni marker terapijskog odgovora kolorektalnog karcinoma na biološku terapiju Cetuksimab-om.

Autori su analizirali razlog izmenjene ekspresije *CDHI* kod bolesnika koji su primili preoperativnu hemioterapiju i kod bolesnika sa različitim odgovorom na terapiju. Luo M i Desai S sa svojim saradnicima u odvojenim istraživanjima su pokazali da vaskularni endotelni faktor rasta podstiče proces epitelno-mezenimalne tranzicije kod karcinoma dojke i pluća što dalje stimuliše invazivnost i metastaziranje malignih ćelija odnosno vodi ka

agresivnoj prirodi tumora. Samuel je još 2011. godine dokazao sa saradnicima moduliranu osetljivost maligne ćelije u zavisnosti od vaskularnog endotelnog faktora rasta.

Istražujući prognostički značaj Vimentina kod bolesnika sa kolorektalnim karcinomom, Du i saradnici su meta-analizom obuhvatili 11 publikacija i preko 1900 bolesnika sa kolorektalnim karcinomom. Utvrđena je povezanost izmenjene ekspresije Vimentina sa preživljavanjem bez bolesti, ukupnim preživljavanjem ali i sa stadijumom tumorske bolesti.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Bogdanovic A, Despotovic J, Galun D, Bidzic N, Nikolic A, Rosic J, Krivokapic Z. Prognostic Significance of CDH1, FN1 and VIM for Early Recurrence in Patients with Colorectal Liver Metastasis After Liver Resection. *Cancer Manag Res.* 2021;13:163-171

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Prognostički značaj biomarkera epitelno-mezenhimalne tranzicije kod metastatskog kolorektalnog karcinoma u jetri“ dr Aleksandra Bogdanovića predstavlja originalni naučni doprinos u sveobuhvatnom istraživanju prognostičkog i prediktivnog značaja odabranih biomarkera procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije kod bolesnika sa primarnim kolorektalnim karcinomom i metastazama u jetri.

Doktorska disertacija je pokazala potencijalni prognostički i prediktivni značaj *CDH1* kod bolesnika sa metastatskim stadijumom kolorektalnog karcinoma. Sprovedeno istraživanje otvara mogućnost daljeg ispitivanja ovog markera na većem broju ispitanika i sa dužim periodom praćenja kako bi se dobili jači medicinski dokazi o značaju ekspresije *CDH1* u dugoročnoj prognozi bolesti. Ukoliko buduća istraživanja potvrde prognostički značaj ekspresije *CDH1*, ono može postati deo izrade genskog profila svakog pojedinačnog bolesnika u rutinskoj svakodnevnoj praksi. Poznavanje genskog profila bolesnika nudi mogućnost personalizovane medicine koja podrazumeva primenu najoptimalnijeg oblika lečenja na osnovu individualnih osobnosti bolesnika i bolesti. Optimizacijom lečenja izbegavaju se nepotrebne terapije i naročito njihovi neželjeni efekti. Kvalitet života obolelih postaje bolji a finansijske uštede globalnih zdravstvenih sistema veće.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Naučni pristup je originalan i pažljivo koncipiran. Ciljevi su precizno definisani a metodologija rada

je 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 Aleksandra Bogdanovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 14.05.2021.

Članovi Komisije:

Prof. dr Vladimir Dugalić

Mentor

Akademik prof. dr Zoran Krivokapić

Akademik prof. dr Predrag Peško

Doc. dr Danijel Galun

VNS dr Aleksandra Nikolić

Prof. dr Goran Stanojević
