

NAUČNOM VEŠTAČENJU U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veštaka Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 16.06.2015. godine, broj 4600/15, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Značaj neinvazivnih dijagnostičkih metoda endometrioze u odnosu na invazivne metode“

kandidata mr dr Milene A. imovi, zaposlene u Opštoj bolnici u Užicu kao na elnik odeljenja Ginekologije i akušerstva. Mentor je Prof. dr Gordana Lazović Radonjić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Aleksandar Stefanović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Snežana Vidaković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Ivan Tulić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu, u penziji

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veštaku u Medicinskog fakulteta sledeće:

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci Milene A. imovi napisana je na 102 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i

literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 10 priloga (8 tabela, 6 slika). Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korištenih u tekstu.

Uvod (37 strana) ima više segmenata. U prvom delu razmatrana je endometrijoza kao bolest, njena etiologija i teorije patogeneze, simptomi bolesti, kao i vidovi dijagnostike. U narednom delu su razmatrani biomarkeri endometrijoze i njihov značaj u dijagnostici i praćenju toka bolesti. U poslednjem poglavlju uvoda razmatrana je klasifikacija endometrijoze i vidovi terapije ove bolesti.

Ciljevi rada (1 strana) su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanje pojedinačne i kombinovane vrednosti biomarkera (CA 125, CA 19.9, CEA, mRNA za Survivin, mRNA za VEGF) u odnosu na dijagnozu endometrijoze, kao i u ispitivanju pouzdanosti kombinacije ovih pet biomarkera i transvaginalnog ultrazvučnog pregleda u postavljanju dijagnoze endometrijoze.

U poglavlju **Materijal i metode (10 strana)** navedeno je da studija je obuhvata 40 pacijentkinja kojima je zbog sumnje na postojanje endometrijoze uradjena dijagnostička laparoskopija sa patohistološkom analizom u jednogodišnjem periodu od 2012.godine do 2013.godine, u Institutu za ginekologiju i akušerstvo, Kliničkog centra u Beogradu i na odeljenju Ginekologije Opšte bolnice u Užicu. Nakon završene patohistološke analize i na osnovu vrednosti serumskih biomarkera pacijentkinje će biti podeljene u dve grupe:

Grupa A – pacijentkinje kod kojih je verifikovano prisustvo endometrijoze

Grupa B - pacijentkinje kod kojih je isključeno prisustvo endometrijoze, ona predstavlja kontrolnu grupu.

U drugom delu ovog poglavlja razmatrani su kriterijumi uključivanja i isključivanja iz studije, kao i principi testiranja i procedure određivanja koncentracije ispitivanih biomarkera. Takođe je detaljno opisana metodologija određivanja nivoa ekspresije gena za survivin i VEGF u uzorcima krvi pacijentkinja. Podaci su analizirani korišćenjem operativnog programa SPSS za Windows. Demografske i kliničke karakteristike su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija i raspon za kontinualne promenljive, odnosno apsolutnim brojevima i procentima za dihotomne i kategorijske varijable. Moguće razlike kategorijskih varijabli su testirane chi - kvadrat (χ^2) - testom. Spearman - ov korelacioni

koeficijent je korišćen za analizu veze između karakteristika bolesti i karakteristika pacijentkinja, uključujući starost pacijentkinja i serumske nivoe biomarkera. Razlike su smatrane statistički značajnim kad je p vrednost bila manja od 0,05 ($p < 0,05$), dok se vrednosti $p < 0.01$ smatraju visoko statistički značajnim

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 191 referencu.

B) Kratak opis postignutih rezultata:

Ovo istraživanje je pokazalo da je CA 125 odličan dijagnostički marker endometriozе, visoke senzitivnosti i specifičnosti, kao i velikog prognostičkog značaja. Određivanje njegove koncentracije zajedno sa drugim biohemijskim markerima predstavlja izazov za dalja istraživanja u neinvazivnoj dijagnostici kao i u prognozi kliničkog toka endometriozе. TVU pregled kao dijagnostički test za ovarijalnu endometriozu ima visoku senzitivnost i specifičnost, stopa lažno negativnih rezultata je veća kod peritonealne endometriozе.

Određivanjem ekspresije mRNA za survivin u uzorku krvi ispitanica utvrđeno je da pacijentkinje sa endometriozom imaju veću ekspresiju survivina od pacijentkinja bez endometriozе i da ekspresija mRNA za survivin kao dijagnostički test za endometriozu ima visoku senzitivnost i specifičnost.

Određivanjem ekspresije mRNA za VEGF u uzorku krvi ispitanica utvrđeno je da pacijentkinje sa endometriozom imaju značajno veću vrednost ekspresije mRNA za VEGF, odnosno da postoji visoka statistička značajnost u ekspresiji VEGF-a između pacijentkinja sa i bez endometriozе. Na osnovu ROC analize utvrđena je tačka preseka (cut-off vrednost)

za VEGF koja razdvaja dijagnostički pozitivne i negativne žene sa endometriozom. Tačka preseka je 9,5. Ekspresija mRNA za VEGF kao dijagnostički test za endometriozu ima visoku senzitivnost i specifičnost.

Ovo istraživanje je pokazalo da određivanje koncentracija biomarkera (CA 125, Ca 19-9 i CEA) kao i ekspresije mRNA za survivin i ekspresije mRNA za VEGF uz TVU predstavlja jednostavan test koji može doprineti dijagnostici endometrioze, a da se pri tom izbegnu invazivne dijagnostičke metode kao što je laparoskopska hirurgija.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Veliki broj studija je pokazao ulogu CA 125 glikoproteina u neinvazivnoj dijagnostici endometrioze. Koncentracija CA 125 je povećana u serumu pacijentkinja sa dijagnostikovanom endometriozom. Meta analiza Bedaiwy i saradnika je pokazala da senzitivnost CA 125 varira u širokom rasponu od 24% do 94 % (8). Prema meta analizi CA 125 test ima specifičnost od 89% u otkrivanju umerene i teške endometrioze (8). Značajnost CA 125 kod pacijentkinja sa blagom endometriozom je ograničena i pokazuje nezadovoljavajuću osetljivost i specifičnost (8). Senzitivnost CA 125 markera postignuta u ovoj studiji je bila 83,33 %, specifičnost 90%, a granina vrednost koncentracije CA 125 je 35 IU/ml. Takođe naša studija je pokazala postojanje statistički značajne razlike u vrednosti CA 125 između ispitivane i kontrolne grupe pacijentkinja. Povišenu vrednost CA 125 je imalo 26 pacijentkinja (65%), od kojih je 25 imalo potvrđenu dijagnozu endometrioze (96,2%). Rezultati našeg rada su u korelaciji sa do sada publikovanim i pokazali su značajnu kliničku primenu CA 125 markera u dijagnostici endometrioze na ispitivanoj grupi pacijenata.

Nedavno je predloženo da se CA 19-9 kao i serumski protein CEA koriste u dijagnostici endometrioze zajedno sa CA 125. Međutim prava korist ovih proteina kao serumskih biomarkera treba tek da se otkrije. Ca 19-9 kao i CA 125 je glikoprotein i koncentracije su povišene kod pacijentkinja sa Tumora jajnika (24). Mali broj studija je urađen sa ciljem da se utvrdi uloga CA 19-9 proteina kao potencijalnog markera endometrioze. Rezultati dobijenih studija su kontradiktorni. Kurdoglu je pokazao da je Ca 19-9 dragocen

marker za dijagnozu endometriozе, a može se koristiti i za predviđanje pacijentkinja sa teškom endometriozom kada se koristi u korelaciji sa Ca 125 (22). U ovoj studiji pronašli su znatno viši nivo oba tu markera Ca 125 i Ca 19-9 u serumu žena sa endometriozom. Harada i saradnici su nedavno poredili vrednosti Ca 19-9 i Ca 125 i sugerisali da su vrednosti Ca 19-9 korisnije za određivanje ozbiljnosti bolesti (19). Svi pacijenti sa povišenim nivoima CA 19-9 su imali težak oblik endometriozе sugerišu i da bi to mogao biti test posebno pogodan za detektovanje teških oblika bolesti. Serumski nivoi Ca 19-9 se povećavaju u skladu sa napredovanjem kliničke faze bolesti bilo sami ili zajedno sa Ca 125. Sa druge strane Somigliana sa saradnicima detaljnim ispitivanjem nije dobio statističku značajnost CA 19-9 kao markera za endometriozu pojedinačno, kao ni u kombinaciji sa CA 125 (20). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima objavljenim od strane Somigliana. Na uzorku od 40 pacijentkinja nismo dobili statističku značajnost CA 19-9 kao biomarkera endometriozе, samo 5 pacijentkinja (12,5%) je imalo povišenu vrednost Ca 19-9. Na osnovu ROC analize utvrđena je tačka preseka (cut-off vrednost) za Ca19-9 koja razdvaja dijagnostički pozitivne i negativne pacijentkinje sa endometriozom. Tačka preseka u ovoj studiji je 17. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti vrednosti Ca19-9 17 između ispitanica sa i bez endometriozе tj. pacijentkinje sa endometriozom imaju više vrednosti Ca19-9 17 od pacijentkinja bez endometriozе.

U ovoj studiji smo merili ekspresiju mRNA za survivin u perifernoj krvi ispitanica. Ekspresija survivina je zabeležena kod 22 (55%) ispitanica. Od 22 ispitanice sa ekspresijom survivina, kod njih 20 (90.9%) je potvrđena dijagnoza endometriozе, a kod 2 (9.1%) ispitanice nije. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti ekspresije survivina između ispitanica sa i bez endometriozе tj. pacijentkinje sa endometriozom imaju više ekspresiju survivina od pacijentkinja bez endometriozе.

Performanse ekspresije survivina kao dijagnostičkog testa za endometriozu su sledeće: senzitivnost Sn=66.7%, specifičnost Sp=80%, pozitivna prediktivna vrednost PPV=90.9%, negativna prediktivna vrednost NPV=44.4%, stopa lažno pozitivnih nalaza je 2/40 (5%), stopa lažno negativnih nalaza je 10/40 (25%). Mabrouk i saradnici su takodje ispitivali značaj nivoa ekspresije mRNA za Survivin i drugih biomarkera u dijagnozi endometriozе,

senzitivnost ekspresije mRNA za Survivin je iznosila 75%, a stopa lažno pozitivnih nalaza je iznosila 10%. Oni su takodje analizirali senzitivnost prilikom kombinovanja vrednosti ekspresije mRNA za Survivin, nivo Ca125 i nivo Ca 19-9, koja je tada iznosila 87% u 10% lažno pozitivnih rezultata.(183)

U našoj studiji kod ispitanica sa dijagnozom endometrioze, medijana razlike izmedju ekspresije "house keeping" gena (GAPDH) i ekspresije VEGF-a je bila 8,55 (min -0.38, max 11.54). Kod ispitanica bez endometrioze, medijana razlike izmedju ekspresije "house keeping" gena (GAPDH) i ekspresije VEGF-a je bila 10.17 (min 7.33, max 12.31). Postoji statisticki znacajna razlika u ekspresiji mRNA za VEGF-a izmedju pacijentkinja sa i bez endometrioze. Pacijentkinje sa endometriozom imaju značajno veću vrednost ekspresije mRNA za VEGF (8,55 prema 10,17). Obzirom da je ekspresija gena prikazana kao razlika izmedju ekspresije "house keeping" gena (GAPDH) i ekspresije VEGF-a, manja vrednost razlike ukazuje na veću ekspresiju gena. Na osnovu ROC analize utvrdjena je tacka preseka (cut-off vrednost) za VEGF koja razdvaja dijagnosticki pozitivne i negativne pacijentkinje sa endometriozom. Ta tacka preseka je 9,5. Postoji statisticki znacajna razlika u zastupljenosti ekspresije VEGF prikazane kao razlika u ekspresiji "house keeping" gena i VEGF <9,5 izmedju ispitanica sa i bez endometrioze, tj. žene sa endometriozom imaju veću razliku u ekspresiji ova dva gena manju od 9,5 od žena bez endometrioze. Detekcija povišenih nivoa ekspresije mRNA za VEGF u serumu pacijentkinja sa endometriozom može imati veliki značaj za dijagnostiku endometrioze i za bolje razumevanje etiologije bolesti.

Performanse ekspresije VEGF prikazane kao razlika u ekspresiji "house keeping" gena i VEGF <9,5 kao dijagnostickog testa za endometriozu su sledece: senzitivnost $S_n=80.0\%$, specificnost $S_p=70.0\%$, pozitivna prediktivna vrednost $PPV=88.9\%$, negativna prediktivna vrednost $NPV=53.8\%$, stopa lažno pozitivnih nalaza je 3/40 (7.5%), stopa lažno negativnih nalaza je 6/40 (15%).

Mabrouk i saradnici su takodje ispitivali nivo ekspresije mRNA za VEGF u perifernoj krvi pacijentkinja sa bez endometrioze, i u njihovoj studiji nije bilo statisticki značajne razlike

u nivou ekspresije mRNA za VEGF između pacijentkinja sa i pacijentkinja bez endometrioze.(183)

Vodolazka i saradnici su u serumu pacijentkinja kod kojih postoji sumnja na endometriozu preoperativno određivali vrednosti VEGF u kombinaciji sa CA125,annexin V i ICAM-1 pri čemu su dobili senzitivnost 81-90%, a specifičnost je iznosila 63-81%.(191)

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Milena Acimovi** , Snežana Vidakovi , Nataša Mili , Katarina Jeremi , Miloš Markovi , Ana Milošević -Džeri , Gordana Lazović -Radonji . Survivin and VEGF as novel biomarkers in diagnosis of endometriosis. (rad je prihvaćen za publikovanje dana 12.03.2015. u Journal of Medical Biochem).

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Značaj neinvazivnih dijagnostičkih metoda endometrioze u odnosu na invazivne metode**“ dr Milene Acimovi predstavlja originalni naučni doprinos u dosadašnjim malobrojnim ispitivanjima o vrednosti kombinovanja plazma biomarkera za ranu detekciju endometrioze, kao i za potvrdu dijagnoze endometrioze kombinovanih sa ultrazvučnim pregledima.

Analizom vrednosti pomenutih pet biomarkera kod pacijentkinja koje se planirane za hirurški tretman i patohistološku potvrdu endometrioze, dosta se može skratiti period između pojavljivanja prvih simptoma endometrioze i postavljanja dijagnoze. Ukoliko se uz analizu vrednosti biomarkera doda i transvaginalni ultrazvučni pregled sa velikom sigurnošću se mogu izbeći invazivne procedure kao što je dijagnostička laparoskopija koju treba izvesti samo kod pacijenata kojim istovremeno treba i neki operativni zahvat .

Izloženi rezultati ove studije bi predstavljali nau ni doprinos u ranoj dijagnozi endometrioze i veliki korak unapred bi bio utvrđivanje vrednosti biomarkera u rutinskoj klini koj praksi, što je i cilj ovog istraživanja.

Ova doktorska disertacija je ura ena prema svim principima nau nog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaklju ci.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Milene A imovi i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 04.09.2015.

Ilanovi Komisije:

Prof. dr Aleksandar Stefanovi

Prof. dr Snežana Vidakovi

Prof. dr Ivan Tuli

Mentor:

Prof. dr Gordana Lazovi -Radonji
