

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„ Značaj mutacija u genima KIT i PDGFRA u evaluaciji lečenja bolesnika operisanih zbog gastrointestinalnog stromalnog tumora želuca“

kandidata dr Keramatollah Ebrahimija, zaposlenogu Klinici za digestivnu hirurgiju- Prve hirurške klinike, KCS u Beogradu. Mentor Akademik prof. dr Predrag Peško

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ivana Novaković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Predrag Sabljak, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Akademik prof. dr Radoje Čolović, profesor Medicinskog fakulteta u penziji

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 Ebrahimi Keramatollaha napisana je na ukupno 126 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 26 tabela, 15 grafikona i 6 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je detaljno iznesena problematika gastrointestinalnih stromalnih tumora (GIST), jednog relativnog novog entiteta u digestivnoj patologiji. Autor je izneo sve relevantne podatke koji se tiču epidemiologije GIST-a, kliničke slike, kao i osnove i principe dijagnostike ove specifične vrste tumora.

Dalje, autor iznosi principe vezane za patohistološku obradu GIST-a, te naglašava potrebu imunohistohemijske obrade ovih tumora, koja je esencijalna u detaljnoj analizi tumorske agresivnosti, odnosno visoko ynačajna u proceni potencijalnog odgovora na adjuvantnu terapiju.

Posebno su detaljno izneti principi hirurškog lečenja GIST-a. Predstavljen je opseg mogućih hirurških procedura kod GIST-a želuca. Autor naglašava da je za razliku od onkoloških pronicipa kod karcinoma, za GIST adekvatno postići R0 resekciju praktično uz same ivice tumora, odnosno navodi da izvođenje radikalne limfadenektomije kod bolesnika sa ovom grupom tumora nije neophodno.

Zatim nas autor uvodi u analizu genetskih mutacija kod GIST-a. Detaljno su opisani mehaniymi delovanja transmembranskih tiroyin kinaznih receptora, odnosno opisani su mehaniymi regulacije ćelijskog rasta, hiperproliferacije, ali I blockade ovih receptora, te ćelijske smrti. Autor naglašava posebno dva gena, koji su od značaja u evaluaciji GIST-a. To su KIT i PGDFRA (platelet derived growth factor alpha). Predstavljeni su tipovi mutacija koje se najčešće javljaju na ovoim genima, odnosno njihova učestalost, te eventualni značaj na klinički tok bolesti.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od prikazivanja osnovnih demografskih i kliničkih karakteristika grupe operisanih bolesnika sa GIST-om želuca u ispitivanom periodu. Kao osnovi cilj ove studije autor navodi ispitivanje genetskih mutacija na KIT i PDGFRA genima, prikayivanje njihove učestalosti, vrste mutacija, te potom korelacije ovih specifičnih genskih mutacija sa patohistološkim i imunohistohemijskim karakteristikama tumora. Takođe, jedan od ciljeva je i korelacija genetskih mutacija na KIT i PDGFRA sa kliničkim tokom operisanih bolesnika.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o prospektivnoj kliničkoj studiji, koja je sprovedena na Klinici za digestivnu hirurgiju- Prvoj hirurškoj klinici, KCS, a u saradnji sa centrom za genetska istraživanja, Klinike za neurologiju, KCS. Detaljno su opisani kriterijumi za uključenje u studiju, kao i kriterijumi za isključenje iz studije. Autor detaljno inosi standardnu preoperativnu pripremu, histološku obradu tumora, metodologiju “stejdžinga” bolesti, kao i precizan plan praženja bolesnika. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključenja u studiju. Načinejna je statistička obrada, od osnovne deskriptivne statistike, zatim korelacione

statističke metode poređenja kliničkih i patohistoloških parametara, odnosno korelacija genetske analize sa kliničkim i histološkim parametrima. Načinjena je i univarijantna analiza i multivarijantna analiza kroz regresione modele, a u cilju identifikacije patohistoloških, odnosno genetskih parametara koji su od značaja za klinički ishod, te preživaljavanje u ovoj grupi bolesnika.

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 183 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U ovoj grupi ispitivano je 100 bolesnika koji su u periodu od 2005- 2016 godine operisani na Centru za hirurgiju jednjaka, Prve hirurške klinike, KCS zbog GIST-a želuca. Od ukupno 100 pacijenata, bilo je 51 žena i 49 muškaraca, starosti u rasponu od 23 do 84 godine (prosečna starost 60,39 godina). Kao najčešći preoperativni simptom u ovoj grupi bolesnika navedena je melena, a kao drugi bolovi u epigastrijumu. Svi pacijenti su primarno hirurški lečeni. Učinjene su sledeće operacije: 57 wedge resekcija, 3 Billroth I, 3 Billroth II resekcije, 2 mediogastrične resekcije, 9 subtotalnih gastrektomija, 17 totalnih gastrektomija, 3 distalne ezofagektomije i totalne gastrektomije, 5 Merendino procedura i 1 Garlock-Sweet operacija. Od 100 pacijenata, kod 99 postignuta je R0 resekciona margina, dok je kod jednog pacijenta rezidualni status bio R1 i navedeni pacijent je spadao u grupu visokog rizika.

Pacijenti su podeljeni u 4 grupe prema modifikovanoj klasifikaciji procene rizika po NIH; u grupi vrlo niskog rizika je bio jedan bolesnik, u grupi niskog rizika bilo je 25 pacijenata, u grupi umerenog rizika 28 pacijenata i u grupi visokog rizika 46 bolesnika. Većina tumora, 60 od ukupno 100, bila je lokalizovana u predelu korpusa želuca, 18 u predelu antruma, po 7 u predelu kardije i forniksa, 6 u subkardijalnoj regiji i 2 tumora u predelu korpusa patrljka želuca. Prosečna veličina tumora u celoj grupi pacijenata iznosila je 78,83 mm, u rasponu od 20 do 240 mm.

Intraoperativne metastaze zabeležene su u 9 slučajeva i to u jetri, što čini 9% svih pacijenata, odnosno 17,39% pacijenata sa tumorima visokog rizika; osam od navedenih devet bolesnika sa intraoperativno viđenim metastazama spadali su u grupu visokog rizika, pri čemu je

zapažena statistički značajna povezanost tumora visokog rizika sa postojanjem intraoperativnih metastaza. Osim toga, uočena je i statistički značajna povezanost između mitotskog indeksa i rizika tumora po modifikovanoj NIH (National Institutes of Health) klasifikaciji.

Univariatnom Coxovim regresionim analizom je pokazano da su prediktori kompozitnog događja, koji podrazumeva pojavu smrtnog ishoda ili recidiva bolesti tokom vremena praćenje bolesnika nakon operacije GIST želuca, visok rizik po modifikovanoj NIH klasifikaciji, mitotski indeks veći od 5, nekroza tumora, visok Miettinen skor rizika i visoka celularna anaplazija.

Bolesnici koji imaju tumor sa visokom celularnom anaplazijom imaju skoro 13 puta veću verovatnoću pojave smrtnog ishoda ili recidiva bolesti. Takođe, bolesnici koji imaju mitotski indeks veći od 5/50 HPF imaju skoro 7 puta veću verovatnoću pojave kompozitnog događaja, dok je ta verovatnoća 4,6 puta veća kod bolesnika kod kojih registrovana nekroza tumora.

Cox-ovim univarijantnom regresionom analizom je pokazano da je nekroza tumora jedini predictor kompozitnog događaja tokom vremena praćenje kod bolesnika operisanih zbog GIST želuca i potom lečenih imatinibom. Kod ovih bolesnika je pet puta veća verovatnoća pojave smrtnog ishoda ili recidiva bolesti ukoliko je prisutna nekroza tumora.

Od ukupno 100 ispitivanih bolesnika, kod 45 bolesnika je dobijen mutacioni status, gde su 37 (82%) bolesnika sa KIT mutacijama, 6 (14%) bolesnika sa PDGFRA mutacije i 2 (4%) bolesnika svrstani u "wild type". U grupi sa KIT mutacijama, KIT egzon 9 mutacije su bili pristutni kod 5 (10%) bolesnika od kojih jedan imao KIT egzon 9 insercija, on pripada grupi visokog rizika ali bez pojave metastaze i lokalnog recidiva u period praćenja. Dva bolesnika su sa KIT egzon 9 delecija, jedan od njih iz intermedijarnoj grupi, drugi iz grupe visokog rizika i oba bolesnika su živi bez pojave recidiva i metastaze. Dva bolesnika su sa KIT egzon 9 tačkasta mutacija, jedan iz grupe intermedijarnog i drugi iz grupe visokog rizika i oba bolesnika su živi bez metastaze i recidiva. Korelacijom između tipova mutacije i stepena rizika po modifikovanoj NIH klasifikaciji, konstatovano je da u grupi bolesnika sa KIT egzon 11 mutacijom veći procenat u visoko rizičnoj grupi, te da među bolesnicima koji imaju GIST viskog rizika veći broj onih koji imaju KIT egzon 11 mutacije. Pokazano je da postoji statistički značajna povezanost između vrednosti mitotskog indeksa i tipova mutacije u KIT genu ($p=0,021$), dok u ostalim slučajevima nije dokazano postojanje statistički značajne povezanosti između ispitivanih varijabli.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Do danas, ovo je prva opsežna studija vezana za GIST sprovedena u našoj zemlji. Epidemiološke karakteristike pacijenata su detaljno iznesene u ovoj studiji. Srednja starost bolesnika u momentu postavljanja dijagnoze bila je oko 60 godina, što je u potpunoj korelaciji sa rezultatima iz jedne multicentrične serije iz Koreje sa 406 bolesnika. U navedenoj seriji odnos muškog i ženskog pola je bio 38,7 prema 61,3, za razliku od naših rezultata gde je odnos muškog i ženskog pola bilo približno isti (49 prema 51) koji je više u korelaciji sa rezultatima objavljenih na osnovu analize 1057 bolesnika od strane Kim-a i saradnika.

Melena je bila najčešći simptom i to kod 41 bolesnika, a uz to treba dodati i prisustvo hematemeze kao dominantnog simptoma kod dva bolesnika. Što se literaturnih podataka tiče, pretpostavka je da je oko 70% GIST-a simptomatično, oko 20% ne daje nikakve simptome, a oko 10% se nalazi u obdukcionim nalazima. Za razliku od naše studije, gde je krvarenje iz gornjih partija GIT-a bilo dominantan simptom, ono se u literature javlja kao dominantan simptom kod oko 40% bolesnika, dok je najčešći simptom prisustvo abdominalnog diskomfora, odnosno dispepsije ili tupih epigastričnih bolova. (Ramonah a et al W J Gastroenterol Oncol A gist of gastrointestinal stromal tumors a review 2013).

U našoj studiji, po lokalizaciji tumora u želuca najčešća lokalizacija je bila u predelu korpusa kod 60 bolesnika potom u predelu antruma kod 18 bolesnika, na ovo treba dodati da kod dva bolesnika GIST je bio lokalizovan u predelu patrljka želuca nakon prethodne resekcije želuca. Ovi rezultati ukazuju da je 80% tumora je bio lokalizovan u predelu korpusa i antruma što se uklapa sa najčešćim rasporedom Cajalovih ćelija u zidu želuca. U studiji Kim-a i saradnika, preko 50% gastričnih GIST lokalizovano je u proksimalnom želucu, u srednjem partijama oko 30%, a ispod 20% u završnom delu želuca. Ovakvi rezultati su u diskrepanci sa dispibucijom Cajal-ovih ćelija u želucu, i očigledno je da sama anatomska distribucija ovih ćelija nije jedini predisponirajući factor kada govorimo o lokalizaciji GIST-a u želucu.

Uzimajući u obzir veličine, lokalizaciju i ekspanzivnost tumora u našoj seriji od 100 bolesnika imali smo spektar različitih hirurških intervencija uključujući izrazito zahtevne i specifične hirurške intervencije kao što su Merendino i Garlock-Sweet procedure kao i proširenu i totalnu gastrektomija, kao i subtotalnu gastrektomiju.

U seriji od 111 bolesnika iz Južne Koreje¹⁷⁵ odnos ivičnih resekcija i radikalnih hirurških intervencije je 61% prema 36%, u našoj seriji ovaj odnos je 57% prema 43%. Razlog za češće

izvođenje opsežnijih resekcionih procedura u našoj seriji ležu verovatno u činjenici da su u odnosu na druge studije tumori u ovoj seriji imali nešto veći prosečni dijametar (naša studija 7.2 cm, prosečno u literaturi od 3.2 do 5.6 cm).

Ukupno gledano u našoj seriji kod 27 bolesnika vidjene su metastaze u jetri i lokalni recidiv, njih 9 nisu primali imatinib i 8 od njih su egzistirali tokom perioda praćanja i jedan bolesnik je živ. Ostali 18 bolesnika sa metastazama i lokalnim recidivom su nakon metastazektomije ili ekstripacije recidiva primali imatinib i od njih, 4 bolesnika su egzistirali i 14 su živi. The Spanish Society of Medical Oncology (SEOM) guidelines iz 2016 godine preporučuje 3 godine adjuvantne primene imatiniba u dozi od 400 mg. dnevno za GIST visokog rizika. Slične preporuke su predložene i od strane Joensuu i saradnici. Primena adjuvantne terapije Imatinibom u intermedijarnoj i niskoj rizik grupi nije predloženo u navedenim serijama.

Uzevši u obzir metološke poteškoće sa kojima smo se susreli u toku DNK analize, procenat od 45% koji je zabeležen u našoj studiji ne predstavlja relevantan podatak u proceni stvarne učestalosti KIT i PDGFRA mutacija kod bolesnika sa GIST-om želuca. U najvećoj studiji koja se bavila učestalošću i značajem i KIT i PDGFRA mutacijama koju su sprovedeli Wozniack i saradnici učestalost mutacija iznosila je 82.5%. Ovakva učestalost prikazana je i u Norveškoj populacionoj studiji gde je iznosila 85,4%, dok je u studiji koja je proučavala efekte imatiniba sprovedene od strane Evropske organizacije za istraživanje i lečenja carcinoma (EORTC) procenat mutacija iznosio 86.2%. Dakle, prema ovim literaturnim podacima treba zaključiti da je procenat gastrointestinalnih stromalnih tumora kod kojih se javljaju genetske mutacije između 80 i 90%, odnosno da se genetske mutacije dešavaju u većini ovih tumora, te da su ovi događaji molekularni pokretači i determinante kliničkog ponašanja ovih tumora.

Među mutacijama na KIT genu, KIT egzon 11 delecija je bila najučestalija i zabeležena je u 45% slučajeva. Ovaj rezultat odgovara i distribuciji KIT mutacija objavljenih u studiji provedenoj od strane Joensuu i saradnika, kod kojih je zastupljenost KIT egzon 11 delecija takođe iznosila oko 43%. U već spomenutoj seriji Wozniaka i saradnika učestalost KIT 11 mutacije iznosila je 61.1%, dok su mutacije na KIT egzonu 9 bile prisutne kod 7.3% ispitanika. Sličan odnos distribucije mutacije na KIT genuma prikazan je i u Norveškoj populacionoj studiji (KIT 11 75%, KIT 9 5.6%), odnosno u francuskoj MolecGIST studiji (KIT 11 59.1%, KIT 9 5.6%). Dakle, prema rezultatima naše studije, in a osnovu do sada objavljenih literaturnih podataka jasno je da je KIT mutacija na egzonu 11 najčešće molekularno dešavanje kod GIST-a.

Ako posmatramo odnos KIT egzon 11 delecije sa drugim patološkim parametrima GIST želuca u našoj seriji ukazuje da ova mutacija ima statistički značajnu korelaciju sa većim

mitotskim indeksom. Capelli i saradnici ukazali da pacijenti sa GIST-om želuca koji imaju KIT egzon 11 deleciju su praćeni sa lošijim patološkim parametrima kao što su prisustvo tumorske nekroze, hipercelularnosti, veća veličina tumora i veći mitotski indeks.

PDGFRA mutacija je bila znatno manje zastupljena u našoj seriji u odnosu na KIT mutacije. Ovaj rezultat je u skladu sa opsegom navedenim literaturnim podacima gde se raspon učestalosti PDGFRA mutacija kreće od 5.2% do 22% kod Miettinen-a i saradnika. Lasota i saradnici navode da većina bolesnika sa GIST koji imaju PDGFRA mutacije sa dominantno imali epiteloidni tip tumora sa niskim mitotskim indeksom i benignim karakterom.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Ebrahimi K, Sabljak P, Simić A, Skrobić O, Veličković D, Šljukić V, Novaković I, Dobričić V, Micev M, Peško P. SIGNIFICANCE OF KIT AND PDGFRA MUTATIONS IN GASTRIC GIST IMATINIB – NAIVE SURGICALLY TREATED PATIENTS u Vojnosanit Pregl 2019; Decembar vol. 76 (No. 12) DOI: 10.2298/VSP180205048E

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Značaj mutacija u genima KIT i PDGFRA u evaluaciji lećenja bolesnika operisanih zbog gastrointestinalnog stromalnog tumora želuca“ dr Keramatollah Ebrahimija, kao prva prospektivna studija bolesnika operisanih zbog GIST-a želuca u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju ove specifične patologije. Autor je detaljno obradio ovu grupu bolesnika, te istakao značaj dobre patohistološke obrade i temeljnog hirurškog rada u lećenju ovih bolesnika, sa posebnim osvrtom na značaj ispravne stratifikacije rizika u praćenju bolesnika nakon operacije.

Genetske mutacije na KIT i PDGFRA genima GIST-a, predstavljaju dodatan iskorak u razumevanju bioloških mehanizama GIST-a, te je autorov doprinos u ovoj oblasti neprocenjiv. Klinička primena rezultata ove studije je više nego očigledna. Analizom genetskog statusa GIST-a, bila bi omogućena detaljnija i preciznija stratifikacija rizika od metastaziranja i recidiva GIST-a, čime bi se i neki aktuelni vodiči za lećenje ovih tumora u našoj zemlji mogli opravdano modifikovati, pre svega u cilju obezbeđivanja adekvatne adjuvantne terapije, odnosno subklasifikacije onih sa izrazito povećanim rizikom za loš klinički ishod i njihovog detaljnog praćenja i multimodalnog lećenja.

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 Ebrahimi Keramatollaha i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 27.06.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Ivana Novaković

Doc. dr Predrag Sabljak

Akademik prof. Dr Radoje Čolović

Mentor:

Akademik prof. dr Predrag Peško
