

Одлуком бр.74/99 донетој на 99. седници Наставно-научног већа Медицинског факултета ВМА од 26.03.2022. године, прихваћен је извештај ментора о завршеној докторској тези и формирана је комисија за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом:

„Утицај клиничко-патолошких карактеристика примарног меланома коже и имунобиолошких параметара метастатски измењеног лимфног чвора стражара на ток и исход болести“

Кандидата **асистента др Милице Рајовић**, запослене у Клиници за пластичну хирургију и опекотине

Ментори:

Пуковник проф. др Ненад Степић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду

ВС Проф.др Љиљана Радосавчев, Медицински факултет Војномедицинске Академије Универзитета одбране у Београду

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације у саставу:

1. ВС Проф. др Лидија Кандолф–Секуловић, редовни професор Медицински факултет Војномедицинске академије- председник
2. Пук. Проф. др Ненад Степић , редовни професор, Медицински факултет Војномедицинске академије- члан
3. ВС Проф.др Љиљана Радосавчев, ванредни професор, Медицински факултет Војномедицинске академије- члан
4. ВС Проф.др Снежана Церовић, редовни професор, Медицински факултет Војномедицинске академије- члан
5. Доц. др Срђан Николић , доцент, Медицински факултет Универзитета у Београду

Детаљном анализом приложене докторске дисертације, комисија са оцену завршеног докторског рада једногласно подноси Наставно-научном већу Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја докторске тезе

Докторска теза је написана на 111 страна и подељена на следећа поглавља: увод (27 страна) ; хипотеза и циљеви истраживања (2 стране), материјал и методе истраживања (13 страна); резултати (28 страна); дискусија (20 страна); закључци (2 стране) и литература (20 страна). Теза је употпуњена са 4 слике, 32 табеле и 11 графикона . Цитирано је 150 референци. Рад по својој сруктури садржи све елементе докторске дисертације.

Фокус истраживања које је предмет приложене докторске дисертације представља корелација клиничкопатолошких карактеристика примарног меланом, статуса лимфног чвора стражара, статуса не-сентинелских лимфних чворова са током и исходом болести.

Увод докторске тезе даје приказ епидемиологије меланом, клиничких и хистопатолошких карактеристика типова меланом коже и класификацију према савременим водичима. Поред приказа фактора ризика за развој меланом детаљно је обрађен и значај клиничких и патохистолошких карактеристика (дебљина тумора, присуство улцерације, микросателитозе, број митоза, ниво инвазије, присуство тумор инфилтришућих лимфоцита, лимфоваскуларне и перинеуралне инвазије и присуство преегзистирајуће промене, невуса у меланому). У уводу је даље дат преглед дијагностичких процедура са посебним освртом на методу детекције и биопсије сентинелног лимфног нодуса, и дијагностички значај исте. Обрађени су различити до сада познати предиктивни фактори метастатског раста у сентинелном (првом лимфном чвору у који се дренира подручје тумора) као и потенцијални предиктори (патохистолошки параметри метастаског сентинелног нодуса) на основу којих би се могли

издвојити пацијенти код којих постоји велиак вероватноћа метастатске захваћеност и несентинелних (осталих лимфних чворова регионалног лимфног басена), што директно условљава избор хируршке терапије код ових болесника. Посебан део увода посвећен је имунологији меланома. Телије меланома имају посебан имуногени профил и пружају одговарајући модел за истраживање антитуморског одговора, што је допринело откривању нових циљних молекула за развој ефикасних терапеутских стратегија у лечењу малигнух тумора. У тези су обрађени параметри имунолошког одговора у лимфном чвору стражару који су до сада идентификовани као прогностички за ток и исход болести. CD3, CD4, CD8, FOXP3, PD-1, као и експресија индолеамин 2,3 деоксигеназе (IDO) у лимфном чвору стражару.

Др. Рајовић се као специјалиста пластичне хирургије посебно бави аспектима терапијске стратегије код болесника са позитивним сентинелним лимфним нодусом. Као резултат обимних истраживања, у већини европских земаља напуштен је дугогодишњи доктринарни став о неопходној комплетној дисекцији лимфног басена након откривања метастаза у сентинелном лимфном нодусу. Уместо тога опредељују се за редовне тромесечне ултразвучне контроле и адјувантну терапију као стандард у лечењу болесика у стадијуму III. Међутим, када се узме у обзир чињеница да комплетна дисекција лимфног басена утиче на локалну контролу болести, а да је доступност адјувантне терапије често ограничена, проблем одлуке код којих болесника радити комплетну дисекцију и даље је веома актуелан и није у потпуности разјашњен.

Досадашња испитивања мање су се бавила могућношћу предикције метастатске захваћености несентинелских лимфних нодуса на основу карактеристика позитивног сентинелног лимфоног нодуса, као и предикције тока и исхода болести. Публиковани резултати често су контрадикторни и не сасвим свеобухватни, што је оставило простора да се др Рајовић фокусира за потенцијално нове предикторе којима би се могла вршити селекција болесника за најсврсиходнији вид терапије.

На основу података из литературе постављене су хипотезе истраживања:

1. Клиничко-патолошке карактеристике примарног меланома коже, имунохистопатолошке карактеристике у метастатски изумењеном лимфном чвору стражару и статус у осталим не-сентинелским лимфним

чворовима у дренажућем басену корелирају са током и исходом болести.

2. Одређене карактеристике примарног меланома и истраживани параметри метастатски измењеног лимфног чвора стражара у одређеним случајевима су значајни прогностички фактори за статус у не-сентинелским лимфним чворовима и на основу њих се може предвидети даљи ток болести и неопходност комплетне лимфонодисекције дренажног басена, односно избегавање исте.

Циљеви рада су прецизно дефинисани:

1. Утврдити степен детекције, сензитивност, специфичност и тачност методе обележавања лимфног чвора стражара ⁹⁹м технецијум-наноколоидом у откривању присуства микрометастаза у нашој популацији и присуства микрометастаза на основу укупног броја процедура и добијених позитивних, тачно и лажно негативних налаза.
2. Испитати корелацију клиничко-патолошких карактеристика примарног меланома у односу на присуство микрометастаза
3. Испитати клиничко-патолошке карактеристике примарног меланома, морфолошке карактеристике и локалну експресију FOXP3, IDO, CD4 и CD8 рецептора метастатски измењеног стражарског лимфног чвора као предикторе постојања метастаза у осталим лимфним чворовима дренажућег басена.
4. Испитати корелацију клиничко-патолошких карактеристика примарног меланома и имунохистопатолошких карактеристика метастатског лимфног чвора стражара у односу на присуство метастаза у осталим лимфним чворовима дренажућег басена после комплетне дисекције
5. Дефинисати класификациону схему која би могла да укаже на постојање метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима на основу клиничко-патолошких карактеристика примарног меланома и имунохистопатолошких карактеристика метастатског лимфног чвора стражара
6. Испитати корелацију између клиничко-патолошких карактеристика примарног меланома и имунохистопатолошких карактеристика

метастатског лимфног чвора стражара са током болести, дефинисаном стопом релапса болести, стопом прогресије, периодом без релапса болести, као и стопама трогодишњег и укупног преживљавања.

У поглављу **Материјал и методе** прецизиран је дизајн истраживања: кохортна проспективна, делом ретроспективна студија са периодом праћења преживљавања без болести и укупног преживљавања од минимум три године. Етички комитет ВМА дао је одлуком од 27.12.2017. одобрење са извођење планираног истраживања. У студију је на основу дефинисаних критеријума укључено 410 пацијената лечених у Клиници за пластичну хирургију и опекотине Војномедицинске академије и редовно контролираних у Амбуланти за меланом ВМА у периоду од 2011. до 2017 године, којима је учињена биопсија лимфног чвора стражара. Ток болести и преживљавање праћени су до априла 2021 (1-117 месеци, медијана 33 месеца). Детаљно су описане методе биопсије лимфног чвора стражара, методе хистопатолошке обраде узорка лимфног чвора стражара, начин скорирања оптерећења тумором у лимфном чвору стражару проценом морфолошких критеријума метастатског сентинелног лимфног нодуса; као и методе имунохистохемијског одређивања степена експресије CD4, CD8, FOXP3 и индоламин-2,3-диоксигеназе. Обрађене су и технике извођења реексцизије сектора коже око ожиљка након операције примарног тумора као и техника комплетне дисекције несентинелских лимфних чворова дренажујућег лимфног басена.

Добијени подаци су анализирани помоћу SPSS софтвера верзија 20.0. У истраживању су коришћене методе дескриптивне статистике, т-тест и χ^2 -квадрат тест за поређење фреквенција, логистичка регресија за предикцију исхода, Каплан-Мајерова (Kaplan-Meier) крива преживљавања и лог-ранк тест за поређење између испитиваних група. Коксова (Cox) пропорционална регресиона анализа је коришћена за процену нивоа ризика са интервалом поверења од 95%. Униваријантна и мултиваријантна логистичка регресија су приказане на основу присуства метастаза (да/не), у СЛН и НСЛН као бинарног исхода са *Odds Ratio* који представља величину ефекта у интервалу поузданости од 95% у моделу коваријата. Ниво статистичке сигнификантности подразумевао је вредности $p < 0,05$.

Дискусија је написана јасно и прегледно уз приказ података других истраживања са упоредним прегледом добијених резултата докторске дисертације.

Закључци сажето приказују најважније налазе који су проистекли из резултата рада .

Коришћена **литература** садржи списак од 150 референци.

Кратак опис постигнутих резултата

1. Сентинелни лимфни нодус је сцинтиграфски и интраоперативно детектован у 99,02% пацијената са специфичношћу од 82.35%. Начин обележавања (метода двостуког обележавања колоидним радиофармаком и плавом бојом или метода обележавања искључиво радиофармаком) као и време протекло од екцизионе биопсије до биопсије сентинелног лимфног нодуса – није утицало на степен детекције СЛН. На основу дањег тока болести, само у 5,6% пацијената лимфни чвор стражар проглашен је “лажно негативним”.
2. Од испитиваних клиничко и хистопатолошких предиктора појаве метастаза у лимфном чвору стражару, значајно већи ризик био је везан за нодуларни тип меланома у односу на друге клиничко-патолошке типове; дебљину примарног меланома по Бреслоу већу од 4 мм, присуство улцерације, и број митоза већи од 6 по квадратном милиметру који двоструко увећавају ризик за метастазе у СЛН; присуство тумор инфилтришућих леукоцита и микросателита, као и периваскуларне инвазије у примарном меланому. Акрална локализација примарног меланома је такође представљала предуслов за појаву метастаза у лимфном чвору стражару. Није уочена корелација између клиничкопатолошких параметара примарног меланома и појаве позитивних несентинелских лимфних чворова
3. Проценом додатних морфолошких критеријума метастатског СЛН одређивањем: микроанатомске локализације метастазе, максималног дијаметра највећег метастатског фокуса, те максималне површине метастазе као и дубине инвазије метастазе тј. удаљености метастатског фокуса од капсуле лимфног чвора показано је да мултифокална и субтотална локализација метастатског депозита у лимфном чвору

стражару јесу предиктивни фактори за појаву позитивних несентинелских лимфних чворова. Дијаметар метастатског фокуса већи од 1 мм је такође је био фактор ризика за појаву метастаза у несентинелским лимфним чворовима.

4. Интратуморска експресија, тј позитивна реакција CD4, CD8 и IDO-а била је чешћа код пацијената са позитивним несентинелским лимфним чворовима, а присуство метастаза у несентинелским лимфним чворовима је искључиво повезано са факторима оптерећења лимфног чвора стражара тумором и експресијом CD4, CD8 и IDO-а.
5. Исход болести зависио је од позитивности лимфног чвора стражара, али не и од времена од ексцизионе биопсије до биопсије лимфног чвора стражара
6. Стопа трогодишњег преживљавања код пацијената са позитивним лимфним чвором стражаром била је 16,6%, без утицаја експресије имунолошких фактора у лимфном чвору стражару
7. Време до прогресије болести било је дуже код пацијената код којих је констатовано присуство тумор инфилтришућих лимфоцита, изражен пигмент и уочена регресија у примарном меланому
8. Преживљавање без удаљених метастаза било је дуже код пацијената са дебелином по Бреслоу мањом од 4 мм, без улцерације, а са присуством тумор инфилтришућих лимфоцита у примарном меланому.
9. Пацијенти са једним екстирпираним позитивним лимфним чвором стражаром су имали дуже преживљавање
10. Укупно време преживљавања није било у корелацији са статусом позитивног лимфног чвора стражара, али јесте са клиничкопатолошким параметрима примарног меланома

Упоредни приказ резултата докторске тезе са резултатима из литературе

Кандидат др Милица Рајовић садржајно и критички сагледава резултате овог истраживања са постојећим подацима из литературе из области дијагностике и модалитета лечења болесника са меланомом коже.

Степен детекције СЛН у овом испитивању 99.0%, специфичност методе од 94.6% као и налаз метастатског захватања СЛН од 20.7% у складу је са резултатима других студија. Подаци из литературе који се односе на време

протекло од дијагнозе меланома до времена када је рађена биопсија СЛН су веома оскудни, а нарочито ако је овај интервал значајно већи од препорученог (до 6 недеља). Истраживањем које било предмет докторске тезе просечно време до биопсије СЛН је износило 55 дана. Није утврђена повезаност између учесталости позитивних СЛН, тока и исхода болести са једне и периода (мање од 6, између 6 и 12 недеља и више од 12 недеља) до биопсије СЛН са друге стране.

Поред већ установљених предиктора постојања метастаза у сентинелном лимфном чвору које наводе бројни аутори у својим испитивањима – овим истраживањем је добијена висока предиктивна вредност за нодуларни тип меланома и акралну локализацију примарног тумора о чему нема довољно података у литератури. Није уочена корелација између клиничкопатолошких параметара примарног меланома и појаве позитивних несентинелских лимфних чворова - што наводе и други аутори.

Од параметара оптерећења тумором у лимфном чвору стражару као предиктивни фактор за појаву метастаза у НСЛН показана је позитивна корелација за дијаметар метастазе већи од 1 mm, док дубина инвазије, односно, удаљеност од капсуле није била значајан предиктор за појаву метастазе у НСЛН, што је у складу са наводима из литературе.

Резултатима раличитих студија протеклих година, показана је позитивна корелација између периода без прогресије и броја CD4+ тумор инфилтришућих лимфоцита, као и броја CD8+ тумор инфилтришућих лимфоцита, као и негативна корелација између броја перитуморских PD-L1+ лимфоцита и тока болести. Иако анти-PD-1/PD-L1 инхибитори имају значајан клинички доказан исход код нересктабилних метастаза, АЈСС стадијум III/IV и регрутовани су за адјувантни третман, њихова улога у раном стадијуму (позитиван СЛН) остаје непозната. Студије других аутора су указале на експресију IDO у лимфном чвору као независни фактор прогнозе за одређивање ризика појаве метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима. Анализом имунолошких параметара у оквиру ове докторске тезе уочена је повезаност интратуморске експресије CD4 на лимфоцитима са налазом метастатског депозита у не-сентинелским чворовима као и тренд високе интратуморске експресије CD8 код пацијената код којих је нађена метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима. И експресија IDO-а била је чешћа код пацијената код којих је постојала метастаза

у не-сентинелским чворовима 73,3% vs. 43,8%, што указује да би коришћење овог маркера могло помоћи у селекцији пацијената са мање повољном прогнозом у I и II стадијуму болести.

Код пацијената оболелих од меланома коже, уочена је разлика у току и исходу болести у односу на параметре примарног тумора, параметре оптерећења тумором лимфног чвора стражара, статус несентинелских лимфних чворова, као и у односу на локацију удаљених метастаза. Описане су разлике у дужини укупног преживљавања, периода без прогресије болести и периода до појаве удаљених метастаза. У нашем истраживању није показало као статистички значајна разлика у преживљавању у односу на локализацију примарног меланома. Укупно преживљавање пацијената било је значајно дуже код женског пола са SSM и другим облицима ненодуларног меланома уколико је дебљина по Бреслоу била мања од 4 мм, са одсутном улцерацијом и бројем митоза до 5 по милиметру квадратном, као и код пацијената којима је констатовано присуство тумор инфилтришућих лимфоцита и изражен пигмент у примарном тумору, а одсутна лимфоваскуларна и перинеурална инвазија као и микросателити. Код пацијената код којих је забележен смртни исход, код њих 80% примарни меланом имао је улцерацију. Ови подаци се уклапају у досадашња истраживања која су утврдила да је женски пол, присуство пигмента, тумор инфилтришућих лимфоцита, одсутна лимфоваскуларна инфилтрација и микросателитоза у корелацији са дужим укупним преживљавањем.

Такође, доказана је статистички значајна разлика у исходу болести код пацијената са метастатски измењеним лимфним чвором стражаром у односу на оне са негативним лимфним чвором стражаром, али није уочена статистичка значајност у односу на време до биопсије SLN и исход болести. Нема много литературе која указује на максимални дозвољени временски интервал до извођења биопсије лимфног чвора стражара, али је у неколицини спроведених студија такође утврђено да нема статистички значајне разлике у преживљавању без рецидива (PFS) и укупном преживљавању (OS) и временског интервала до биопсије SLN.

Време без прогресије болести (енгл. *progression-free survival*, PFS) било је краће код пацијената који су имали више од једног екстирпираниог лимфног чвора као и код локализације лимфног чвора стражара на врату. Није било статистички значајне разлике у времену до прогресије болести у односу на локализацију

метастаза у лимфном чвору стражару по Девару и дијаметру метастатског фокуса у лимфном чвору стражару по Ротердаму.

Време преживљавања без удаљених метастаза (енгл. *distant metastasis-free survival, DMFS*) било дуже код особа женског пола, код локализације примарног меланома на горњим екстремитетима, код SSM патохистолошког типа, код дебљине меланома по Бреслоу мањој од 4 мм, код одсуства улцерације и броја митоза до 5/мм², те код присуства тумор инфилтришућих леукоцита у примарном меланому, као и код пацијената који су у примарном меланому имали изражен пигмент. Статус SLN био је у корелацији са временом преживљавања без удаљених метастаза. Уочено је статистички значајно дуже преживљавање код пацијената који су имали један дренажни базен, аксиларну локализацију СЛН, 1 екстирпирани метастатски измењен SLN, локализација а пацијенти са вишеструким метастазама у лимфним чворовима имали су лошији PFS и DMFS. Према подацима из MSLT-II студије 9% пацијената је развило је удаљене метастазе, што је значајно мање него у истраживању др Рајовић, и указује на каснију дијагнозу меланома у нашој популацији. Ипак, медијана преживљавања без удаљених метастаза у овом истраживању је била 133 недеље (2,5 године), без обзира на позитивност SLN и учињену CLND, што је слично као у горе поменутој студији где је време до удаљених метастаза било око две године.

Укупно преживљавање је било дуже код пацијената са једним екстирпираним лимфним чвором стражаром у односу на пацијенте са више екстирпираних лимфних чворова стражара. Није било статистички значајне разлике ни у односу на број дренажних басена, локализацију басена, те локализацију као и дијаметар метастатског депозита у лимфном чвору стражару. Време од патохистолошке дијагнозе примарног меланома до биопсије лимфног чвора стражара није утицало на укупно преживљавање пацијената. Слични резултати добијени су и у мањем броју других студија које су се бавиле овом темом.

У односу на експресију испитиваних имунолошких параметара у лимфном чвору стражару (FoxP3, CD4, CD8, IDO, PDL-1) није било статистички значајне разлике у стопама трогодишњег преживљавања, верованто због мале величине узорка.

Објављени радови из докторске дисертације:

1. **Rajović M**, Jaukovic L, Kandolf Sekulovic L, Radulovic M, Petrov N, Mijuskovic Z, Stepic N, Nikolic Z. Regional lymph node metastases in cutaneous melanoma: a single-center analysis from southeast Europe. Scand J Surg. 2021 Dec;110(4):498-503. doi: 10.1177/1457496921992936. Epub 2021 Feb 14. PMID: 33586532. **(IF:1,95), M22**
2. Jaukovic L, **Rajović M**, Kandolf Sekulovic L, Radulovic M, Stepic N, Mijuskovic Z, Petrov N, Ajdinovic B. Time to Procedure, Nuclear Imaging and Clinicopathological Characteristics as Predictive Factors for Sentinel Lymph Node Metastasis in Cutaneous Melanoma: A Single-Center Analysis. Ann Plast Surg. 2018 Jul;81(1):80-86. **(IF-1.45,) M23**

Закључак и предлог

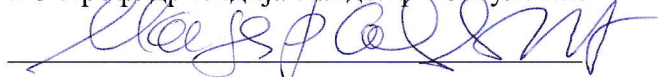
Кандидат асистент др Милица Рајовић испињава све услове који обухватају написану докторску дисертацију и из ње проистекле објављене радове у по једном часопису категорије M22 и M23 са импакт фактором 1.95 и 1.45, а у којима је кандидат први односно други аутор.

Докторска дисертација „Утицај клиничкопатолошких карактеристика примарног меланома коже, морфолошких критеријума и параметара имуноског одговора у метастатском лимфном чвору стражару на ток и исход болести“ је оригиналан и врло актуелан научни рад из области дијагностике и лечења меланома коже. Истраживање је спроведено према важећим начелима Етичког приступа научноистраживачког рада. Добијени резултати дају оригинални и значајан допринос истраживању клиничко патохистолошких и имунолошких параметара као предиктора тока и исхода болести, а на основу којих би се могла вршити примеренија селекција болесника за комплетну лимфнодисекцију као вид лечења пацијената са меланомом коже.

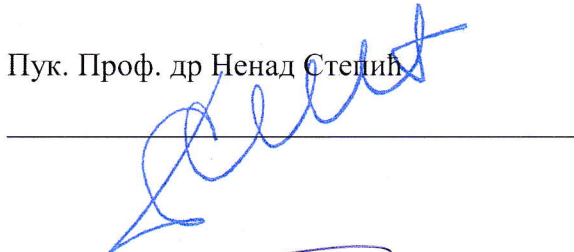
На основу свега изнетог, а имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, комисија је мишљења да докторска теза др Милице Рајовић испуњава све предвиђене критеријуме које захтева академска пракса. С обзиром да кандидат испуњава све предвиђене услове за одбрану докторске дисертације Комисија једногласно предлаже Одбору за специјалистичке и докторске студије да прихвати извештај и сходно томе да предложи Наставно-научном већу ВМА УО да овај рад прихвати као завршену докторску тезу и омогући јавну одбрану исте.

Београд, 05.08.2022.

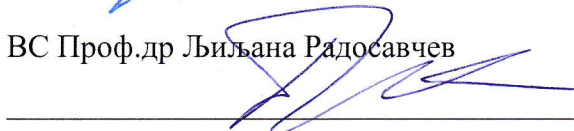
ВС Проф. др Лидија Кандолф – Секуловић




Пук. Проф. др Ненад Степић



ВС Проф. др Љиљана Радосавчев



ВС Проф. др Снежана Церовић



Доц. др Срђан Николић

