

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА КРАГУЈЕВАЦ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ
ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Одлука Наставно–научног већа Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, одржаној дана 03.06.2015. године, одлуком 01-5586/3-44 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „**Утицај генског полиморфизма bcl-2+ и тус+ утврђених FISH-ом на прогнозу болесника са дифузним Б крупноћелијским лимфомом лечених имунохемиотерапијом**“ кандидата Снежане Сретеновић, у следећем саставу:

1. **Проф. др Милан Кнежевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, председник;
2. **Проф. др Биљана Михаљевић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан;
3. **Доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Снежане Сретеновић и подноси Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Докторска дисертација кандидата Снежане Сретеновић под називом „**Утицај генског полиморфизма bcl-2+ и тус+ утврђених FISH-ом на прогнозу болесника са дифузним Б крупноћелијским лимфомом лечених имунохемиотерапијом**“, урађена под менторством доц. др Слободанке Митровић, доцента Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка анатомија, представља оригиналну студију која се бави испитивањем утицаја појединачног и удруженог оштећења bcl-2 и тус гена на прогнозу оболелих од дифузног Б крупноћелијског лимфома. Дифузни Б крупноћелијски лимфом (енгл. *Diffuse large B-cell lymphoma*)

представља дифузну пролиферацију великих неопластичних Б лимфоцита, веома хетерогену, како на клиничком тако и на генетском и молекуларном нивоу. Различитост је условљена подтипом ДБКЛ, генетским аберацијама, стањем болесника, проширеношћу болести итд. Спада у групу агресивних лимфома што значи да нелечен. Дијагноза ДБКЛ се поставља на основу патохистолошког налаза и фенотипских карактеристика доказаних имунохистохемијским методом, клиничке слике, лабораторијских параметара, биопсијом косне сржи као и Мултислајсна компјутеризована томографија (енгл. *Multislais computer thomographi- MSCT*) који ће омогућити стадирање по *Ann Arbor* класификацији. Симптоми и клинички знаци оболелих, могу се поделити на оне узроковане туморском масом и опште симптоме. У процени прогнозе болести се користе старост болесника, ниво лактат дехидрогеназе, ECOG статус (енгл. *Eastern Cooperative Oncology Group*), клинички стадијум и екстранодална захваћеност, чији збир утврђује вредност интернационалног прогностичког индекса (енгл. *International Prognostic Index- IPI*). Клинички прогностички фактори укључени у IPI користе се за процену исхода код болесника са ДБКЛ више од 10 година. Наведени прогностички модел није се показао клинички значајним у смислу побољшања резултата лечења, међутим, истраживања која обједињују генетске и имунофенотипске карактеристике ДБКЛ, у комбинацији с клиничким параметрима, кључна су за прогнозу и индивидуализацију терапије оболелих.

Стални су покушаји изналажења нових морфолошких и молекуларних маркера који би имали прогностички и предиктивни значај. Развојем технологије, омогућено је анализирање великог броја гена из туморског ткива, али обзиром на тешку изводљивост и високу цену ове методологије показано је да се и имунохистохемијским анализама и Флуоресцентном хибридизацијом *in situ* (енгл. *Fluorescence in situ hybridization- FISH*) могу утврдити генски полиморфизми. Bcl-2, као антиапоптотски протеин игра важну улогу у развоју и диференцијацији Б лимфоцита. Прекомерна експресија bcl-2 протеина у лимфомима је последица хромозомске транслокације t-14,18(q 32:21) или амплификације на положају 18q21 где се налази ген који кодира његову синтезу и повезана је са резистенцијом на хемотерапију и лошијом прогнозом. Продукт тус гена је транскрипциони протеин који контролише велики сет циљних гена који учествују у ћелијском циклусу, метаболизму, репарацији DNA, одговору на стрес и синтези протеина. Удруженост оштећења bcl-2 и тус гена (bcl-2+/тус+, енгл. *double hit*), чини чак 62% свих лимфома према *Mitelman*-овој бази података. Постојање bcl-2+/тус+ је утврђено у знатно мањој мери и код болесника са ДБКЛ, са огромним интересовањем научне јавности тек последњих година. Повезаност између IPI скорa и генског полиморфизма до данас није проучавана. Резултати овог истраживања омогућавају селекцију болесника за генску анализу, јер се идентификацијом генског полиморфизма (bcl-2+/тус+) код оболелих од ДБКЛ, утврђује и корелација са клиничким параметрима и IPI, која може бити путоказ у стадирању болесника и може да детерминише индивидуални имунохемиотерапијски третман сваког појединца, уз прецизније предвиђање исхода болести.

2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Претрагом литературе прикупљене детаљним претраживањем биомедицинских база података "Medline", и "KoBSON" помоћу следећих кључних речи: дифузни крупноћелијски лимфом, bcl-2, тус, FISH, двоструко оштећење гена (енгл. *double hit mutation*) и интернационални прогностички индекс, пронађено је неколико студија донекле сличног дизајна и методолошког приступа, спроведених у различитим земљама Европе и света, али ниједна студија оваквог типа никада није спроведена на популацији људи у Србији. Истраживање је засновано на савременим научним сазнањима и

најактуелнијим трендовима из области хематологије и хематопатологије, методолошки је добро постављено и на одговарајући начин спроведено. Резултати ове студије ће допринети бољем планирању терапијског третмана оболелих од ДБКЛ.

На основу тога Комисија сматра да докторска дисертација кандидата др Снежане Сретеновић под насловом „Утицај генског полиморфизма bcl-2+ и тус+, утврђених FISH-ом на прогнозу болесника са дифузним Б крупноћелијским лимфомом лечених имунохемиотерапијом“ представља резултат оригиналног научног рада.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

Снежана Сретеновић је рођена 1967 године у Горњем Милановцу. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу завршила је 1993. године са просечном оценом 9,11 и тиме стекла звање доктора медицине. Након обављеног лекарског стажа и положеног стручног испита, радила је као стручни сарадник на Медицинском факултету у Крагујевцу, од 1994. до 1996. године, када заснива радни однос у КЦ Крагујевац и започиње специјализацију из Интерне медицине. На Медицинском факултету у Београду полаже специјалистички испит 2001. године са одличном оценом и стиче звање специјалисте интерне медицине. Субспецијализацију, уже области хематологија, уписује школске 2005. године на Медицинском факултету Универзитета у Београду, усмени испит полаже децембра 2006., а априла 2008. брани рад уже специјализације под називом ”Анализа ефеката лечења болесника са дифузним крупноћелијским Б лимфомом хемиотерапијом vs. имунохемиотерпијом“. Одбраном рада стиче звање субспецијалисте хематолога. Докторске академске студије, изборно подручје Клиничка и експериментална интерна медицина, уписала је 2009. године на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу, усмени докторски испит положила у јуну 2011 са оценом 10. Звање примаријуса стиче јануара 2015. године. Члан је Лекарске коморе Србије, Српског лекарског друштва, Српске лимфомске групе и Европског удружења хематолога. Удата је и мајка двоје деце.

Б. Списак објављених радова (прописани минимум за одбрану докторске дисертације)

Др Снежана Сретеновић се, уз клинички рад, активно бави и научно-истраживачким радом у Клиници за Хематологију КЦ Крагујевац. Као аутор или коаутор објавила је 44 научно-истраживачких радова (25 ауторских, 19 коауторских радова), од којих је 9 објављено у целини. Објавила је један рад као први аутор и два коауторска рада у часопису од међународног значаја (категорија М23 и М52), два рада у целини као први аутор и један коауторски у часописима националног значаја (категорија М53), 10 је презентовала на националним конгресима и конгресима лекара са међународним учешћем, а 25 на међународним конгресима (категорија М34 и М64). Остварила је укупно 22,5 бода, 8 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета.

Радови објављени у часописима међународног или националног значаја:

1. Sretenović S, Mitrović S, Čemerikić-Martinović V, Marković O, Mirković N. BCL-2 Expression in Predicts Overall survival in Patients with Diffuse Large B Cell Lymphoma. What choose? Wulfenia Journal, 2015; 22(3): 506-518. (M23-3 бода)
2. Đurđević P, Radovanović D, Sretenović S, Necin-Jovanović Ž, Živić D, Bogojević R, Đukić S, Anđelković N. Burkitts lymphoma as possible cause of acute abdomen - case report.

3. Mirković N, Novaković B, Sretenović Ž, Sretenović S, Đurđević P. Endovascular laser ablation of the great saphenous vein in patients with Von Willebrand disease. Ser J Exp Clin Res, 2013; 14(2):77-80. (M52-1,5 бод)
4. Sretenović S, Mihaljević B, Anđelković N, Anđelić B, Jaković LJ, Janković S, Jančić-Nedeljkov R. Prognostički činioci kod obolelih od difuznog krupnoćelijskog B limfoma. Timočki medicinski glasnik, 2012; 37(2): 65-73. (M53-1 бод)
5. Sretenović S, Necin Jovanović Ž, Stojanović V, Jovanović D. Anemija usled deficita gvožđa-naše iskustvo. Timički medicinski glasnik 2014; 39 (1): 20- 24. (M53-1 бод)

2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Одобрени циљеви истраживања и постављени циљеви у раду су остали исти. Примењена методологија истраживања је идентична са одобреном. Докторска дисертација др Снежане Сретеновић написана је на 137 страна и садржи следећа поглавља: увод, циљеви и хипотезе студије, испитаници, материјал и методологија, резултати, дискусија, закључак и литература. Рад садржи 29 табела и 88 графикана. Поглавље литература садржи 180 цитираних библиографских јединица из домаћих и иностраних стручних публикација.

У првом поглављу аутор у три подпоглавља уводи читаоца у савремену класификацију и ширину проблема лимфома уопште и ДБКЛ, са епидемиолошког, клиничког и цитоморфолошко-молекуларног аспекта. Прво подпоглавље износи дефиницију, класификацију и патогенезу, као и клиничка обележја и модалитете лечења. У другом подпоглављу описују се цитоморфолошке и имунофенотипске карактеристике ДБКЛ, док треће подпоглавље указује на значај цитогенетских аберација детектованих различитим методама. Сва подпоглавља су допуњена опсежним прегледом литературе и текстуално и табеларно приказаним резултатима студија спроведених у Европи и свету, које су се бавиле проучавањем дијагностике, терапијским опцијама и прогностичким факторима везаним за ДБКЛ.

У другом поглављу јасно су изложени циљеви истраживања као и конкретни задаци који су у складу са постављеним циљевима. Ова студија одговара на питање колика је заступљеност генског полиморфизма одређеног FISH-ом у нашој популацији, као и каква је његова повезаност са IPI код болесника са ДБКЛ. Први циљ био је да се утврди утицај и прогностички значај појединачног и удруженог генског полиморфизма, bcl-2+ и тус+, на терапијски одговор код болесника са ДБКЛ лечених стандардном имунохемотерапијом. Други циљ био је да се утврди коју групу пацијената, према IPI и другим прогностичким параметрима, треба обавезно тестирати на генски полиморфизам и тако поставити смернице за индивидуализовани терапијски приступ без непотребног исцрпљивања болесника стандардном терапијом. Главне хипотезе истраживања су биле да оболели од ДБКЛ са појединачним или двоструким оштећењем гена (bcl-2+ и/или тус+, енгл: *double hit* ДБКЛ) показују лошији одговор на примењену имунохемотерапију од bcl-2 - и/или тус- ДБКЛ), као и да постоји значајна разлика у присутности генског полиморфизма код болесника са различитим клиничким параметрима, посебно у групама са различитим вредностима IPI. Највећи део хипотеза је потврђено добијеним резултатима.

Треће поглавље, „Испитаници, материјал и методологија“ рада подударни су са наведеним у пријави дисертације и презентовани су на одговарајући начин, уз податак о добијеној сагласности за истраживање Етичког одбора КЦ Крагујевац. Објашњени су

критеријуми и начин одабира пацијената, врсте варијабли који су биле анализирани и детаљно је описан начин статистичке анализе добијених података. Студија је осмишљена и спроведена као ретроспективна, клиничко-експериментална и компаративна, упоређивала је тестиране параметре оболелих од ДБКЛ у оквиру стандардног испитивања болесника са ниским и средње ниским IPI, који су контрола анализирани групе са средње високим и високим IPI. У истраживање је укључено 90 болесника оболелих од ДБКЛ до марта 2010. године, којима је дијагноза постављена на основу клиничких, лабораторијских, патохистолошких и имунофенотипских карактеристика узоркованог ткива и биопсије кости, а IPI скор прорачунат по стандардном методу. Свим болесницима је урађена мултислајсна компјутеризована томографија грудног коша и абдомена на презентацији и након завршене терапије, узоркована је крв за анализу у јутарњим сатима и биоптирана је кост чији је ткивни узорак, након техничке обраде и калупљења, сечен на 3-5 микрона дебеле резове за стандардну хистолошку и даљу, јасним протоколима дефинисану имунохистохемијску и FISH анализу, којима се одређивао имунофенотип туморских ћелија и утврђивао bcl-2 и mtc статус ДБКЛ.

У четвртом поглављу систематично су приказани резултати истраживања и добро су документовани са 29 табела и 88 графикана, уз нарративне коментаре представљених резултата који су детаљно анализирани у наредном поглављу.

У петом поглављу „Дискусија“, анализирани су добијени резултати и поређени са литературним подацима из ове области добијеним сличним истраживањима спроведеним у Европи и свету. Резултати су упоређивани са постављеним хипотезама студије и делом их потврђују. Упућен је и критички осврт на учесталост и прогностички значај појединачног и удруженог оштећења bcl-2+ и/или mtc+ гена, као и на корелацију са клиничким параметрима и IPI, што би могао постати стандард у основном стадирању болесника, а тиме би се могао детерминисати индивидуални терапијски приступ сваком појединцу оболелом од ДБКЛ, уз прецизније одређивање прогнозе.

Коментари добијених резултата су јасни, а начин приказивања података чини их прегледним и разумљивим.

Литература је адекватна по обиму и садржају. Цитирано је 180 библиографских јединица из домаћих и иностраних стручних публикација.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација у наслову „**Утицај генског полиморфизма bcl-2+ и mtc+ утврђених FISH-ом на прогнозу болесника са дифузним Б крупноћелијским лимфомом лечених имунохемотерапијом**“ по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања су садржани у следећим закључцима:

1. Генски полиморфизам bcl-2+ и mtc+ дефинисан FISH-ом, како појединачан тако и удружен, нема утицаја на терапијски одговор и укупно преживљавање болесника са ДБКЛ третираних стандардном имунохемотерапијом.
2. Истовремено постојање bcl-2+ и mtc+ не показује корелацију са IPI, па самим тим не може бити предиктор одлуке о обавезном тестирању.

3. Не постоји значајна статистичка разлика у исходу и укупном преживљавању између оболелих од ДБКЛ који су bcl-2+, у односу на bcl-2- ДБКЛ, нити постоји значајна разлика у укупном преживљавању болесника са ДБКЛ који су тус+, у односу на тус-.
4. Истовремена експресија bcl-2+ и тус+ показује лошији одговор на терапију у односу на bcl-2- и тус- ДБКЛ, али без статистички утврђене значајности.
5. Између пацијената са високим и ниским IPI ризиком постоји разлика у учесталости bcl-2+ и тус+, али без статистичке значајности.
6. Упоредна анализа прогностичког значаја двоструких оштећења и IPI није показала значајан утицај на преживљавање ни код испитаника са ниским ризиком, ни код испитаника са високим IPI ризиком. У групи bcl-2+ и тус+ испитаника и ниским IPI ризиком, једногодишње преживљавање било је 83,3%, двогодишње 66,7% и није се мењало до краја периода од 78 месеци праћења. Преживљавање у групи ниског ризика са негативним налазом на оба напред наведена гена након годину дана и после две године износило је 70% после три године 58,3% колико је било и после 84 месеца праћења.
7. Код испитаника са високим IPI ризиком и bcl-2+ и тус+, преживљавање после годину дана износило је 28,6%, после две године 14,3%, док нико од оболелих из ове групе није живео дуже од три године. Преживљавање и bcl-2- и тус-, групе високог ризика, било је након годину дана 60,6%, после две 36,3% а након три 24,2% колико је било и после 54 месеца праћења. Није утврђена статистички значајна разлика међу испитаницима високог IPI ризика са и без присуства испитиваних генских полиморфизама, а тиме ни њихов прогностички значај.
8. Испитаници рефрактерни на терапију имали су статистички значајно краће преживљавање од испитаника који су имали било какав одговор на примењено лечење, нико из ове групе испитаника није живео дуже од 33 месеца. У случају предикције рефрактерности на терапију добијене вредности сензитивности и специфичности указују нам на малу ваљаност посматраних генских полиморфизама у предвиђању појаве рефрактерности на терапију.
9. Постизање комплетне ремисије или одсуства болести, након примене прве терапијске линије није зависило од присуства тестираних генских мутација, како појединачно тако ни удружено.
10. Мултиваријантном Cox-овом анализом утврђени су независни предиктори преживљавања, без обзира на присуство других фактора у оболелих од ДБКЛ, а то су: ECOG статус, комплетна ремисија, рефрактерност на терапију, bcl2/ИНН утврђена позитивност и CRP.
11. Резултати молекуларних анализа морају се корелирати са клиничким, морфолошким и имунохистохемијским информацијама, а све наведено сугерише да постоји истовремено више механизма који условљавају да једна трећина болесника и поред примењене терапије, умире од ДБКЛ.

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Постојање генског полиморфизма bcl-2+ и тус+, појединачног или удруженог, се показао као лош прогностички параметер одговора на примењену хемиотерапију у различитим нехочкинским лимфомима. Повезаност између IPI скорa и генског полиморфизма до данас није проучавана. Резултати овог истраживања одговарају на

питање колика је заступљеност генског полиморфизма одређеног *FISH*-ом у нашој популацији, као и каква је његова повезаност са *IPI* и другим клиничким параметрима код болесника са агресивним ДБКЛ. Анализом генског полиморфизма код болесника оболелих од ДБКЛ, дефинише се корелација са клиничким параметрима и *IPI*, која би могла постати путоказ у основном стадирању болесника и индивидуалном терапијском приступу.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности:

Део коначних резултата истраживања је већ презентован у форми научног рада, као оригинално истраживање у часопису од међународног значаја са импакт фактором, категорије M23:

Sretenović S, Mitrović S, Čemerikić-Martinović V, Marković O, Mirković N. BCL-2 Expression in Predicts Overall survival in Patients with Diffuse Large B Cell Lymphoma. What choose? Wulfenia Journal, 2015; 22(3): 506-518.

Планирано је и да остали резултати овог истраживања буду публиковани као оригинално истраживање у часописима од међународног значаја и у форми усмених и постер-презентација на националним и међународним конгресима.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др Снежане Сретеновић под називом „Утицај генског полиморфизма *bcl-2+* и *muc+* утврђених *FISH*-ом на прогнозу болесника са дифузним Б крупноћелијским лимфомом лечених имунохемиотерапијом“ на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру дисертације засновано на савременим научним сазнањима и да је адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата др Снежане Сретеновић урађена под менторством доц. др Слободанке Митровић, представља оригинални научни рад и има велики научни и практични значај у разумевању утицаја *bcl-2+* и *muc+* генског полиморфизма на прогнозу оболелих од ДБКЛ лечених имунохемиотерапијом.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом „Утицај генског полиморфизма *bcl-2+* и *muc+* утврђених *FISH*-ом на прогнозу болесника са дифузним Б крупноћелијским лимфомом лечених имунохемиотерапијом“, кандидата др Снежане Сретеновић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Милан Кнежевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка анатомија, председник

Проф. др Биљана Михаљевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Интерна медицина, члан;

Доц. др Иван Јовановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан.

Крагујевац, 22.06.2015