

Univerzitet u Nišu
Medicinski fakultet Niš

Nastavno-naučnom veću

Predmet: Izveštaj Komisije o izrađenoj doktorskoj disertaciji kandidata mr sc. med. Irene Conić

Odlukom Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Nišu od 29.5.2014. godine prihvaćen je izveštaj mentora Prof. dr Zorice Stanojević o izrađenoj doktorskoj disertaciji mr sc. med. Irene Conić pod naslovom “Klinički tok karcinoma jajnika u zavisnosti od patohistoloških i imunohistohemijskih karakteristika tumora”.

Imenovana je komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije u sastavu:

1. Prof. dr Svetislav Vrbić, predsednik
2. Prof. dr Zorica Stanojević, mentor i član
3. Prof. dr Ljubinka Janković-Veličković, član
4. Prof. dr Darjana Jovanović, član sa MF u Novom Sadu
5. Doc dr Miljan Krstić, član

Komisija pregledom doktorske disertacije donosi sledeći

IZVEŠTAJ

Tema za izradu doktorske disertacije mr sc.med. Irene Conić odobrena je odlukom Nastavno-naučnog veća broj 04-811/11, na sednici održanoj 27.4.2012.godine

Doktorand mr sc. med. Irena Conić obavila je istraživanje u Klinici za onkologiju KC Niš i Centru za patologiju KC Niš u periodu od 2005- 2011. godine.

I Odnos izrađene doktorske disertacije prema prijavljenoj i odobrenoj temi

Doktorska teza “Klinički tok karcinoma jajnika u zavisnosti od patohistoloških i imunohistohemijskih karakteristika tumora” predstavlja originalan i samostalan naučno-istraživački rad iz oblasti onkologije.

Naslov doktorske disertacije je u potpunosti saglasan sa sadržajem sprovedenog istraživanja. Ciljevi i metodologija rada su ostali nepromenjeni tokom celog toka istraživanja.

II Tehnički opis disertacije

Doktorska disertacija je napisana na 175 strana, i sastoji se iz 9 poglavlja: uvod, cilj istraživanja, material i metodologija, rezultati, diskusija, zaključci, pregled literature, lista skraćena, sažetak i prilozi (biografija i izjave). Disertacija sadrži 47 tabela i 21 sliku.

III Sadržajna struktura doktorske disertacije

Uvod:

Karcinom jajnika je osmi po učestalosti maligni tumor u svetu, peti najčešći tip karcinoma kod žena i četvrti najčešći uzrok smrti od karcinoma kod žena. Procenjuje se da će se do 2030. godine broj žena obolelih i umrlih od karcinoma jajnika uvećati za približno 60%, a stope mortaliteta će i dalje biti veće u razvijenim (5,1/100.000) nego u nerazvijenim (3,1/100.000) zemljama sveta. Od karcinoma jajnika godišnje u Srbiji u proseku oboli 820 i umre oko 420 žena. Među ženama u Srbiji rak jajnika je šesti vodeći malignitet u obolevanju (5,0%) i sedmi u umiranju (4,6%). Kod ranog otkrivanja i lečenja karcinoma jajnika, pre nego što se proširi van primarne lokalizacije, petogodišnja relativna stopa preživljavanja iznosi 92%. Nažalost, samo 15% svih karcinoma jajnika otkriva se u ranoj fazi. Primećeno je da je preživljavanje veće kod žena mlađih od 65 godina, nego kod starijih i varira u zavisnosti od morfološkog tipa karcinoma jajnika, opšteg zdravstvenog stanja i stadijuma raširenosti bolesti u vreme postavljanja dijagnoze. Tačan uzrok nastanka karcinoma jajnika još uvek nije poznat, ali mnogi faktori rizika povezani su sa nastankom ovog malignoma. Radi blagovremenog otkrivanja i lečenja karcinoma jajnika u ranoj fazi važno je prepoznavanje simptoma bolesti kao što su loše varenje, mučnina, nadutost, nadimanje, gubitak apetita, bol u donjem delu trbuha, promene u pražnjenu creva i učestalo mokrenje koje traju više od 12 dana tokom poslednjeg meseca.

Ćelije karcinoma i embrionalne matične ćelije (ESCs) imaju mnoge ključne biološke osobine. Glavna osobina oba ćelijska tipa je posedovanje velikog proliferativnog potencijala koji je važan kako za embriogenezu tako i za razvoj tumora. Pluripotentnost je takođe bitna za ESCs i dovodi do diferenciranja ćerki ćelija u zreлом embrionu. Slično tome, izgleda da postoje multipotentne kancerske ćelije koje mogu nakon transplantacije da daju tumor iz koga su potekle. Takve tumor inicirajuće ćelije, često označene kao kancerske matične ćelije (CSCs), doprinose tumorskoj homeostazi, međutim, molekularni mehanizmi koji su u osnovi stalnog rasta i plastičnosti CSCs su slabo razjašnjeni. Samoobnavljanje je od suštinskog značaja za održavanje populacije matičnih ćelija (SC), što je dokazano testovima rasta i za ćelije karcinoma. One se obnavljaju kroz serijsku transplantaciju tumora i formiranje formacija sfera u assays-u.

Ciljevi istraživanja su:

1. Analiza kliničkih i patoloških karakteristika karcinoma jajnika.
2. Utvrđivanje ekspresije Nanog, Sox2, Oct3/4, Sox4, CD44, CD117, Ezh2 i Stat3 na parafinskim presecima karcinoma jajnika.
3. Komparacija ekspresije Nanog, Sox2, Oct3/4, Sox4, CD44, CD117, Ezh2 i Stat3 sa kliničkim i patološkim karakteristikama karcinoma jajnika.

Materijal i metodologija:

Istraživanjem su obuhvaćene bolesnice sa karcinomom jajnika dijagnostifikovane u periodu od 2005. do 2011. godine u regionu južne Srbije. Njihovo preživljavanje praćeno je do oktobra meseca 2013. godine. Analizirano je 270 primarnih karcinoma jajnika i to: karcinomi jajnika ograničeni na jajnike (FIGO stadijum I), karcinomi jajnika prošireni na organe male karlice (FIGO stadijum II), karcinomi jajnika sa peritonealnim metastazama (FIGO stadijum III) i karcinomi jajnika sa udaljenim metastazama (FIGO stadijum IV). Praćeni su klinički parametri bolesnica sa karcinomom jajnika, kao i njihove patološke karakteristike. Klinički parametri koji su analizirani su: godine starosti, FIGO stadijum bolesti, prisustvo i veličina rezidualnog tumora, vrsta terapije i odgovor na terapiju. Patološke karakteristike koje su analizirane su: histološki tip tumora, histološki gradus i nuklearni gradus. Izvor podataka su istorije bolesti bolesnica sa karcinomom jajnika koje su lečene u Klinici za onkologiju KC Niš. Patološka i imunohistohemijska analiza uzoraka karcinoma jajnika obavljena je na Centar za patologiju Medicinskog fakulteta u Nišu. Patohistološka analiza izvršena je na biopsijskim uzorcima karcinoma jajnika koji su fiksirani u 10% neutralnom formalinu, obrađeni u aparatu za automatsku obradu tkiva i ukalupljeni u parafin i sećeni na mikrotomu debljine 5 µm. Nakon deparafinacije i procesiranja u graduisanim alkoholima na odabranim isećcima primenjene su sledeće metode bojenja: 1. Klasična histološka HE metoda: određivanje diferentovanosti tumora i određivanje patološkog stadijuma tumora. 2. Imunohistohemijska Avidin-Biotin Complex (ABC) metoda za detekciju: citoplazmatske i nuklearne ekspresije Nanog, citoplazmatske i nuklearne ekspresije Sox2, citoplazmatske i nuklearne ekspresije Oct3/4, citoplazmatske i nuklearne ekspresije Sox4, membranske ekspresije CD44, citoplazmatske ekspresije CD117, citoplazmatske ekspresije Ezh2 i citoplazmatske ekspresije Stat3.

Za imunohistohemijsku analizu korišćena su mišja i zečja monoklonska antitela na Nanog, Sox2, Oct3/4, Sox4, CD44, CD117, Ezh2 i Stat3. Za imunohistohemijsku analizu korišćeni su parafinski preseki tkiva debljine 5µm. Prema protokolu imunohistohemijske

metode – Avidin-Biotin Complex (ABC), tkivni preseći su deparafinisani, rehidratirani i inkubirani u 30ml/L hidrogen peroksida, da bi se blokirala endogena peroksidaza, a potom isprani u PBS pH=7,4. Sledeći korak bila je inkubacija sa napred navedenim specifičnim antitelima u trajanju od 24h u vlažnoj komori na temperaturi od 4C. Posle ispiranja u PBS-u tkivo je inkubirano sa sekundarnim antitelom (Biotin labeled goat anti-rabbit antibody) u trajanju od 30 minuta. Sledi ponovno ispiranja u PBS-u i inkubacija sa tercijalnim antitelom u trajanju od 30 minuta. Za vizualizaciju markiranih antigena korišćen je di-amino-benzidintetra-hidrohlorid (DAB) u H₂O₂ uz bojenje jedara hematoksilinom. Primarna antitela su zamenjena PBS puferom što je korišćeno kao negativna kontrola, dok su pojedine normalne strukture korišćene kao pozitivna interna kontrola. Analiza imunohistohemijski bojenih mikroskopskih preparata karcinoma jajnik izvršena je pomoću svetlosnog mikroskopa Leica DM 1000. Dobijeni rezultati su sistematizovani i grupisani, a statistička signifikantnost testirana je odgovarajućim statističkim testovima shodno ispitivanim parametrima i veličini uzoraka.

Kvantitativna statistička analiza je sprovedena na računaru. Za upisivanje, rangiranje, grupisanje, tabelarno i grafičko prikazivanje podataka korišćen je Excel program iz Microsoft Office 2003 programskog paketa. Proračuni su vršeni korišćenjem programa R u verziji 2.12.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Zaključci:

Na osnovu kliničkih i imunohistohemijskih ispitivanja molekularnih markera (Nanog, Sox2, Oct3/4, Sox4, CD44, CD117, Ezh2 i Stat3) 278 bolesnica sa karcinomom jajnika mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Kod mucinoznih i endometroidnih karcinoma značajno češće je sprovedena radikalna histerektomija, dok je eksplorativna laparotomija sa biopsijom inoperabilnog karcinoma jajnika urađena isključivo kod seroznih karcinoma.
2. Serozni karcinomi jajnika su značajno češće pokazivali metastatsko širenje u odnosu na mucinozni i svetloćelijski karcinom jajnika.
3. Najveći broj bolesnica primale su hemioterapiju po TC protokolu, u proseku 4,98±1,94 ciklusa, sa prosečnim preživljavanjem od 37,4±22,6 meseci.
4. Svetloćelijski karcinom jajnika pokazivao je najmanje prosečno preživljavanje 30,8±20,0 meseci, značajno češću progresiju bolesti u odnosu na ostale histološke tipove kao i najveću smrtnost koja je iznosila 57,1%.
5. Kompletna remisija bolesti postignuta je značajno češće kod mucinoznog i endometroidnog karcinoma u odnosu na serozni i svetloćelijski tip, sa najmanjom smrtnošću u grupi bolesnica sa mucinoznim karcinomom.

6. Serozni karcinomi jajnika su značajno češće bili u FIGO stadijumu IV, pokazivali su slabiji stepen diferencijacije (histološki i nuklearni gradus) u odnosu na mucinozne karcinome.

7. Najveći broj tumora pokazivao je pozitivnost na Nanog 65,6%, Sox2 67,5%, Oct3/4 48,3%, Sox4 68,8% pri čemu je pozitivna ekspresija Nanog, Sox2 i Oct3/4 i negativna ekspresija Sox4 bila povezana sa starijim uzrastom, FIGO stadijumom III i IV, slabijom diferencijacijom, progresijom bolesti, pojavom metastaza i kraćim preživljavanjem.

8. Niska ekspresija CD44 i odsustvo CD117 reaktivnosti povezana je sa starijim uzrastom, češćom progresijom bolesti i kraćim preživljavanjem.

9. Ispitivani serozni karcinomi jajnika pokazivali su značajno visoku ekspresiju Sox2, CD117 i Stat3; svetloćelijske karcinome karakterisala je značajno povećana ekspresija Nanog i Oct3/4; endometroidne karcinome snižena ekspresija Oct3/4 i povećana reaktivnost na Stat3, dok je karakteristika mucinoznih karcinoma jajnika bila smanjena Stat3 imunoreaktivnost.

10. Nije nađena značajna razlika u ekspresiji CD44 i Ezh2 u ispitivanim podtipovima epitelnih kancera jajnika.

11. Nepovoljan klinički tok karcinoma jajnika bio je povezan sa pozitivnom ekspresijom Nanog, Sox2, Oct3/4, i odsustvom ili niskom ekspresijom Sox4, CD117 i CD44, dok su pokazatelji značajno dužeg preživljavanja bili gubitak ekspresije Ezh2 i Stat3 u karcinomu jajnika.

IV Ocena naučnog doprinosa doktorske disertacije

Urađena doktorska disertacija predstavlja originalni naučno-istraživački rad kandidata sa značajnim doprinosom u oblasti onkologije. U okviru ispitivanja, patohistološka analiza izvršena je na biopsijskim uzorcima karcinoma jajnika koji su fiksirani u 10% neutralnom formalinu, obrađeni u aparatu za automatsku obradu tkiva i ukalupljeni u parafin i sečeni na mikrotomu debljine 5 µm. Za imunohistohemijsku analizu korišćena su mišja i zečja monoklonska antitela na Nanog, Sox2, Oct3/4, Sox4, CD44, CD117, Ezh2 i Stat3. Rezultati ispitivanja pokazali su da je nepovoljan klinički tok karcinoma jajnika bio povezan sa pozitivnom ekspresijom Nanog, Sox2, Oct3/4, i odsustvom ili niskom ekspresijom Sox4, CD117 i CD44, dok su pokazatelji značajno dužeg preživljavanja bili gubitak ekspresije Ezh2 i Stat3 u karcinomu jajnika.

Glavni naučni doprinos doktorske disertacije

Doktorska disertacija “Klinički tok karcinoma jajnika u zavisnosti od patohistoloških i imunohistochemijskih karakteristika tumora” predstavlja originalan naučno istraživački rad kandidata sa značajnim doprinosom u oblasti onkologije.

Karcinom jajnika je osmi po učestalosti maligni tumor u svetu, peti najčešći tip karcinoma kod žena i četvrti najčešći uzrok smrti od karcinoma kod žena. Kod ranog otkrivanja i lečenja karcinoma jajnika, pre nego što se proširi van primarne lokalizacije, petogodišnja relativna stopa preživljavanja iznosi 92%. Nažalost, samo 15% svih karcinoma jajnika otkriva se u ranoj fazi. Primećeno je da je preživljavanje veće kod žena mlađih od 65 godina, nego kod starijih i varira u zavisnosti od morfološkog tipa karcinoma jajnika, opšteg zdravstvenog stanja i stadijuma raširenosti bolesti u vreme postavljanja dijagnoze. Tačan uzrok nastanka karcinoma jajnika još uvek nije nepoznat, ali mnogi faktori rizika povezani su sa nastankom ovog malignoma. Cilj istraživanja je analiza kliničkih i patoloških karakteristika karcinoma jajnika, utvrđivanje ekspresije Nanog, Sox2, Oct3/4, Sox4, CD44, CD117, Ezh2 i Stat3 na parafinskim presecima karcinoma jajnika, kao i komparacija ekspresije Nanog, Sox2, Oct3/4, Sox4, CD44, CD117, Ezh2 i Stat3 sa kliničkim i patološkim karakteristikama karcinoma jajnika. U toku istraživanja korišćena je imunohistochemijska metoda. Korišćeni su parafinski preseki tkiva karcinoma jajnika debljine 5µm. Nepovoljan klinički tok karcinoma jajnika bio je povezan sa pozitivnom ekspresijom Nanog, Sox2, Oct3/4, i odsustvom ili niskom ekspresijom Sox4, CD117 i CD44, dok su pokazatelji značajno dužeg preživljavanja bili gubitak ekspresije Ezh2 i Stat3 u karcinomu jajnika.

The principal scientific contribution of the PhD thesis

Doctoral dissertation “Clinical course of ovarian carcinoma depending on patohistological and immunohistochemicam characteristics” represents an original scientific research work of candidate, contributing significantly to the field of oncology.

According to the frequency of malignant tumours in the world, ovarian carcinoma takes the eighth place; it is also the fifth most frequent tumour in women and the fourth cause of cancer death in women. In early discovering and treatment of ovarian carcinoma, before it extends out of the primary localisation, the five-year relative survival rate is 92%. Unfortunately, only 15% of all ovarian carcinomas are discovered in the early stage. It has been noticed that the survival rate is higher in women under the age of 65 than in the older ones and it varies depending on the morphological type of ovarian carcinoma, patient’s over-all health condition

and the stage of the disease diffusion at the time of setting the diagnosis. The exact cause of ovarian carcinoma occurrence is still unknown, but many risk factors are related to the occurrence of this malignoma. The aim of this research was to analyze the clinical and pathological characteristics of ovarian carcinoma, as well as to determine Nanog, Sox2, Oct3/4, Sox4, CD44, CD117, Ezh2 and Stat3 expressions in paraffin sections of ovarian carcinoma and to compare the Nanog, Sox2, Oct3/4, Sox4, CD44, Ezh2 and Stat3 expressions with the clinical and pathological characteristics of ovarian carcinoma. During the research, the immunohistochemical method was applied. Paraffin sections of the tissue of ovarian carcinoma 5µm thick were used. Unfavourable clinical course of ovarian carcinoma was related to the positive Nanog, Sox2 and Oct3/4 expression, as well as with the absence or low expression of Sox4, CD117 and CD44, while the loss of Ezh2 and Stat3 expressions in ovarian carcinoma, indicated significantly longer survival.

Objavljen autorski rad doktoranda na SCI listi iz oblasti doktorske disertacije:

Conic I, Miljkovic S, Tosic-Golubovic S, Stanojevic Z, Milenkovic D, Djordjevic B, Damnjanovic I, Visnjic M, Antic S, Stefanovic V. Anxiety levels related to the type of therapy for cervical cancer. Central European Journal of Medicine 2012; 7(4): 490-496.

Spisak radova:

1. Conić I, Dimov I, Tasić-Dimov D, Đorđević B, Stefanović V. Ovarian epithelial cancer stem cells. TheScientificWorldJOURNAL 2011;11: 1243-1269.
2. Dimov I, Tasić-Dimov D, Conić I, Stefanovic V. Glioblastoma multiforme stem cells. TheScientificWorldJOURNAL 2011;11: 930-958.
3. Conic I, Miljkovic S, Tosic-Golubovic S, Stanojevic Z, Milenkovic D, Djordjevic B, Damnjanovic I, Visnjic M, Antic S, Stefanovic V. Anxiety levels related to the type of therapy for cervical cancer. Central European Journal of Medicine 2012; 7(4): 490-496.
4. Djordjevic B, Stojanovic S, Conic I, Lj.Jankovic-Velickovic, Vukomanovic P, Zivadinovic R, Vukadinovic M. Current approach to epithelial ovarian cancer based on the concept of cancer stem cells. Journal of BUON 2012; 17: 627-636.
5. Damnjanovic I, Kocic G, Najman S, Stojanovic S, Stojanovic D, Veljkovic A, Conic I, Langerholc T, Pesic S. Chemopreventive potential of alpha lipoic acid in the treatment of culture of colon and cervix cancer cell lines. Bratislava Medical Journal No165/2013. (prihvacen za stampanje).
6. Conić I, Stanojević Z, Dedović I, Lilić G. Anksioznost i depresivnost kod bolesnica sa karcinomom grlića materice pre operativnog lečenja. Acta Medica Medianae 2008; 47(2):49-53.
7. Damnjanović I, Veličković-Radovanović R, Catić-Đorđević A, Kocić R, Ćirić V, Conić I, Bjelaković Lj. Farmakokinetičko i farmakodinamičko modeliranje bazalnih insulina i analoga. Acta Medica Medianae 2009; 48(1):15-19.
8. Damnjanović I, Kitić D, Zlatković-Guberinić S, Milosavljević J, Conić I. Savremeni aspekti upotrebe Valerianae officinalis. Acta Medica Medianae 2010; 49(3):65-70.
9. Ivana Damnjanović, Radmila Veličković-Radovanović, Radivoj Kocić, Snežana Zlatković-Guberinić, Danka Sokolović, Nataša Djindjić, Irena Conić. Uticaj beta blokatora na insulinsku rezistenciju kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2. Acta Medica Medianae 2011; 50(4).

Radovi prezentovani na kongresima:

1. Conic I, Stanojevic Z. The influence of certain typer of cervical cancer therapies on depressiveness of patients. Abstract book. V congress of internal medicine for the south-eastern Europe, Belgrade, Serbia 2009; 49:P90.
2. Conic I, Zdravkovic D, Spasic-Ivanov S, Milenkovic D, Dimic D, Stanojevic Z, Antic S. Abstract book. Da li se kod bolesnika sa dijabetesom tip 2 kasni sa uvodjenjem insulinske terapije? 6. Srpski kongres o šećernoj bolesti sa međunarodnim učešćem, Beograd 2009; 103:PP66.
3. Conic I, Spasic Ivanov D, Zdravkovic D, Dimic D, Antic D. Abstract book. Značaj blagovremenog uvođenja insulinske terapije kod pacijenata sa dijabetesom tip 2. Drugi kongres endokrinologa Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd 2010, 64:A48.
4. Conic I, Stanojevic Z, Potić Zečević N, Pejčić I, Vrbic S. Abstract book. Anxiety levels related to the type of therapy for cervical cancer. 49. Kancerološka nedelja, Beograd 2012, 74:P6
5. Conic I, Stanojevic Z, Filipovic S, Stojnev S, Pejčić I, Vrbic S. Abstract book. Ekspresija CD44, CD117, Sox2, Oct3/4 kod karcinoma jajnika. 50. Kancerološka nedelja, Beograd 2013, 27:03.