

NASTAVNO - NAUČNOM VEĆU

STOMATOLOŠKOG FAKULTETA U BEOGRADU

Nastavno-naučno veće Stomatološkog fakulteta u Beogradu je na prvoj redovnoj sednici održanoj 14.10.2014. godine donelo odluku zavedenu pod brojem 3/91 o imenovanju komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije dr Ivane Ilić Dimitrijević sa naslovom **"Analiza hromozomske translokacije t(11;19) kod mukoepidermoidnog karcinoma pljuvačnih žlezda – korelacija sa kliničkim i histopatološkim parametrima"**.

Na osnovu pregleda priloženog materijala, komisija podnosi Nastavno-naučnom veću sledeći

I Z V E Š T A J

Dr Ivana Ilić Dimitrijević rođena je u Smederevskoj Palanci, 9. 1. 1982. Godine gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je 2009. godine na Stomatološkom Fakultetu u Beogradu sa prosečnom ocenom 8,02. Nakon pripravničkog staža obavljenog na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu, položila je stručni ispit 2010 godine. Prvu godinu doktorskih studija iz naučne oblasti Maksilofacijalna hirurgija na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2010/2011. godine i položila je sve ispite predviđene planom i programom akademskih doktorskih studija.

Nastavno-naučno veće Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu je na šestoj redovnoj sednici održanoj 10.07.2012. godine, usvojilo pozitivan izveštaj stručne komisije za ocenu predloga teme i imenovalo prof. dr Vitomira Konstantinovića kao mentora za izradu ove doktorske disertacije.

Doktorska disertacija dr Ivane Ilić Dimitrijević je napisana na 133 strane, raspoređene u 8 poglavlja: *Sadržaj, Uvod, Pregled literature, Ciljevi, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura*. Dokumentovana je sa 28 fotografija, 12 tabela i 8 grafikona.

U **Uvodu** kandidat ističe značaj primene molekularnog testa za unapređenje dijagnostikovanja i terapije mukoepidermoidnog karcinoma (MEK). Kao posledica hromozomske translokacije t(11;19) nastaje novi, fuzionisani onko-protein MECT1-MAML2. Kandidat ukazuje na značaja preoperativnog određivanja MECT1-MAML2 fuzionog statusa kod MEK-a:

- omogućava egzaktno planiranje i sprovođenje adekvatne hirurške terapije,
- korišćenje radioterapije isključivo kod fuzio-negativnih HG (*high-grade*) MEK-a,
- unapređenje kvaliteta života pacijenta,
- pružanje informacije pacijentu o toku bolesti i mogućnostima lečenja.

Kandidat u uvodu, takođe ističe klinički značaj ovog testa i uvodi u molekulanu patologiju mukoepidermoidnog karcinoma. Poglavlje pregled literature se sastoji iz nekoliko podnaslova u kojima kandidat opisuje sledeće: Opšte kliničke i histopatološke karakteristike MEK-a kao i različite tipove klasifikacija ovog tumora. U podnaslovu molekularna patologija tumora opisane su osnove moderne onkogenetike sa posebnim osvrtom na hromozomske translokacije kod epitelnih tumora. Zatim je detaljno objašnjena fiziologija *notch* signalnog puta kao i njegove izmenjene uloge u patologiji tumora. Takođe u ovom poglavlju kandidat objašnjava značaj CREB (*cAMP response element-binding protein*) signalnog puta u vitalnim fiziološkim procesima ćelije kao i njegovu glavnu ulogu u malignoj transformaciji ćelija i nastanku MEK-a.

U poglavlju **Ciljevi** istraživanja kandidat jasno navodi ciljeve studije :

- Utvrditi povezanost MECT1-MAML2 fuzije sa kliničkim i histopatološkim karakteristikama MEK-a.

Kako bi se glavni cilj ostvario postavljeni su sledeći radni zadatci:

- utvrditi efikasnost AFIP klasifikacije za MEK,
- utvrditi da li je MECT1-MAML2 fuzija specifična za MEK pljuvačnih žlezda,
- ispitati da li MECT1-MAML2 status olakšava dijagnostikovanje HG MEK-a,
- ukazati da su HG MEK i ASC dva različita karcinoma.

U poglavlju **Materijal i metode** kandidat navodi sve segmente studijskog dizajna i opisuje metode koje su korišćene u laboratorijskom delu istraživanja. Detaljno opisuje selekciju uzoraka MEK-a pri čemu su dva patologa nezavisno jedan od drugoga (T.L i Z.T) izvršila reviziju svih uzorka MEK-a koristeći AFIP klasifikacioni sistem, pri čemu je potvrđeno 23 uzoraka MEK-a i 23 uzoraka imitacija MEK-a. U cilju potvrđivanja specifičnosti MECT1-MAML2 fuzije za MEK testirano je svih 23 slučajeva imitacija MEK-a, a od kojih je najučestaliji bio Adenoskvamozni karcinom (ASC). Iz istorija bolesti pacijenta koji su hirurški tretirani na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju dobijeni su sledeći klinički podaci o pacijentima: godine, pol, primarno mesto tumora, veličina tumora, klinički stadijum tumora, prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima i udaljenim metastazama. Podaci o stanju života kao i o uzroku smrti pacijenata dobijeni su iz knjiga umrlih.

U podnaslovu mikrodisekcija i deparafinizacija opisuje se laboratorijski postupak koji ima za cilj detekciju tumorskih ćelija na nebojenim preparatima MEK-a, njihovu disekciju i čišćenje uzorka od parafina u ksilolu i etanolu. Sledeći laboratorijski postupak je izolacija RNK (ribonukleinska kiselina) iz uzorka tkiva MEK-a. Zatim spravljanje smeše od izolovane pacijentove RNK, mešavine odgovarajućih enzima, pufera, nukleotida, prajmera, vode oslobođene RNK-azama. U prvom koraku vrši se reverzna transkripcija RNK u cDNK (dezoksiribonukleinska kiselina) koja odgovara fuzionom transkriptu, a zatim se semeša pušta u PCR (*polymerase chain reaction*) aparatu u odgovarajući program termičkih ciklusa radi amplifikacije cDNA. Dobijeni PCR produkti su analizirani na *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Proizvod dobijen PCR postupkom je prvo razblažen pet puta u vodi. Zatim se 1 μ l ovog rastvora pipetira u 15 μ l HiDi™ formamidu (*Applied Biosystems*), koji sadrži 10 Vol% *GeneScan™-500 Rox™ Size Standard (Applied Biosystems)*. Uzorci sa zapečaćenim poklopcima na tubama stavljaju se u *Genetic Analyser*. Nakon automatskog razdvajanja PCR produkata kapilarnom elektroforezom, rezultati su analizirani *Gene Mapper v.4.0* softverom (*Applied Biosystems*). Kandidat zatim opisuje karakteristike supstanci koje su korišćene u pripremi smeše za PCR.

Pored deskriptivne statistike od statističkih testova primenjen je Fišerov egzaktni test, Hi kvadrat test i studentov T-test. *Kaplan-Meier* metodom prikazana je kriva preživljavanja za kancer specifično petogodišnje vreme preživljavanja kao i za ukupno vreme preživljavanja. Za indetifikovanje nezavisnih prognostičkih faktora korišćena je Koksova multivarijantna regresiona analiza. Takođe je određivana p statistička značajnost za svaku varijablu.

Korelacije između merenih parametara su merene pomoću "*Spearman's rank correlation*" testa. Sve analize izvršene su pomoću statističkog paketa SPSS (*SPSS 20.0, Inc., Chicago, IL, USA*).

U Poglavlju **Rezultati** su najpre u tabeli prikazane kliničko-patološke karakteristike MEK-a. Povezanost MECT1-MAML2 fuzije sa kliničko-patološkim karakteristikama MEK-a, pri čemu je pokazano da su MECT1-MAML2 fuzio-pozitivni slučajevi bili povezani sa nisko-gradusnim tipom karcinoma ($P = 0.02$). Od pet faktora koji konstituišu histološki gradus, dva su pokazala značajnu korelaciju sa prisustvom fuzije, uključujući odsustvo ćelijske nekroze ($P= 0.024$) i nepostojanje anaplazije ($P= 0.024$). Zatim su prikazani faktori koji utiču na petogodišnje kancer specifično vreme preživljavanje kao i ukupno vreme preživljavanja pacijenata. Petogodišnje vreme preživljavanja, vreme do pojave recidiva, kod fuzio-negativnih MEK-a bilo je za srednji gradus MEK-a 60% a kod visokog gradusa 16.7%. Takođe, pacijenti kod kojih su tumori bili veći ($P=0,001$) i sa III/IV kliničkim stadijumom ($P=0.003$) kao i sa histološki potvrđenom nekrozom tumora ($P=0.001$), neuralnom invazijom ($P=0,006$), anaplazijom ($P=0.003$) i povećanom mitotskom aktivnosti tumorskih ćelija ($P=0,013$) pokazali su kraće vreme preživljavanja do pojave recidiva.

Kaplan-Meier analiza pokazala je statističku značajnost za nekoliko varijabli za ukupno vreme preživljavanja pacijenata obolelih od MEK-a. Za MECT1-MAML2 fuzio-pozitivne ($P=0.046$) ukupno vreme preživljavanje bilo je 100%. Pacijenti kod kojih je tumor bio većeg dijametara, ($P=0,008$), sa kliničkim stadijumom III/IV ($P=0.031$), nekrozom tumora ($P=0.002$) i povećanom mitozom tumorskih ćelija ($P=0,004$) pokazali su nižu stopu ukupnog preživljavanja.

Za indentifikaciju faktora korisnih za prognozu pojave recidiva kao i ukupnog preživljavanja rađena je Koksova regresiona analiza. Sledeći faktori su uzati kao polazne varijable: godine pacijenta, pol, lokalizacija tumora, veličina tumora, klinički stadijum tumora, prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, MECT1-MAML2 fuzija i histološki gradus.

Univarijantna analiza je prikazala sledeće faktore kao značajne prediktore za petogodišnje preživljavanje pacijenata bez znakova bolesti: nizak histološki gradus ($P=0.01$), uznapredovala veličina tumora ($P=0.006$) i klinički stadijum ($P=0.015$). Zatim, negativan nalaz metastaza u regionalnim limfnim čvorovima ($P=0.009$), odsustvo

neuralne invazije (P=0.023), nekroza tumora (P=0.015), i anaplazija (P=0.02) takođe su pokazale značajnost. Za MECT1-MAML2 fuziju nije dobijena statistička značajnost za petogodišnju stopu preživljavanja. (P=0.134).

Za ukupno preživljavanja pacijenata univarijantna analiza je pokazala sledeće faktore koji su se pokazali kao značajni prediktori za ukupno preživljavanje: MECT1-MAML2 fuzio-pozitivni MEC (P = 0.018), veličina tumora (P= 0,012), klinički stadijum (P = 0.052), prisustvo tumorske nekroze (P= 0.002) i povećana mitotička aktivnost tumorskih ćelija (P= 0.006).

Kandidat u **Diskusiji** tumači dobijene rezultate i poredi ih sa nalazima drugih, relevantnih studija. Takođe, navodi ograničenja studije i daje smernice za dalja istraživanja. Diskusija je sistematizovana u 4 dela: MECT1-MAML2 fuzija kod HG MEK-a; Specifičnost MECT1-MAML2 fuzije za MEK ; Uticaj MECT1-MAML2 fuzionog statusa na prognozu i terapiju MEK-a; Smernice za dalja istraživanja.

U **Zaključku** se ističe da su MECT1-MAML2 fuzio-pozitivni MEK-i posebna kliničko-patološka vrsta ovog tumora koja se karakteriše niskim gradusom tumora, odsustvom anaplazije i nekrotičnog tkiva u tumoru, kao i manjim kliničkim stadijumom tumora, visokom stopom preživljavanja i dobrom prognozom bolesti. AFIP klasifikacioni sistem za dijagnostikovanje MEK-a se pokazao kao efikasan, pouzdan i lak za upotrebu. Zatim da je MECT1-MAML2 fuzija visoku specifičnost za MEK pljuvačnih žlezda. Kandidat zaključuje da su za uspešnu diferencijalnu dijagnozu HG MEK-a neophodna dodatna imunohistohemijska bojenja kao i da je ASC je posebna vrsta karcinoma a ne sinonim za HG MEK.

Poglavlje **Literatura** sadrži 352 bibliografske jedinice iz strane relevantne literature.

Nakon uvida u dostavljeni tekst, komisija je jednoglasno ocenila da doktorska disertacija dr Ivane Ilić Dimitrijević pod nazivom "**Analiza hromozomske translokacije t(11;19) kod mukoeplidernoidnog karcinoma pljuvačnih žlezda – korelacija sa kliničkim i histopatološkim parametrima**" predstavlja inovativno, samostalno i dobro dokumentovano istraživanje. Ispitivanje hromozomskih translokacija na tumorima pljuvačnih žlezda do sada nije obrađeno u domaćoj literaturi.

Određivanje MECT1-MAML2 fuzionog statusa koji nastaje kao posledica hromozomske translokacije t(11;19) kao molekularni test doprinosi unapređenju dijagnostike i terapije MEK-a pljuvačnih žlezda.

Doktorska disertacija ispunjava sve kriterijume propisane Zakonom o Univerzitetu i statutima Univerziteta i Stomatološkog fakulteta u Beogradu.

Na osnovu iznetog, predlažemo Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta da prihvati izveštaj i oceni kao podobnu za javnu odbranu doktorsku disertaciju dr Ivane Ilić Dimitrijević pod nazivom **"Analiza hromozomske translokacije t(11;19) kod mukoepidermoidnog karcinoma pljuvačnih žlezda – korelacija sa kliničkim i histopatološkim parametrima"**.

U Beogradu,

Doc. dr Milan Petrović
Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Zvezdana Tepavčević
Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. Dr Ivana Novaković
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu