



**ИЗВЈЕШТАЈ**  
*о оијени урађене докторске дисертације*

**I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ**

Наставно-научно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, на редовној сједници одржаној дана 11.06.2020. године, донијело је Одлуку број: 18/3-448/2020 о именовању Комисије за оцјену и одбрану урађене докторске дисертације кандидата mr сц. мед. Живорада Гајанина под насловом: „Прогностички значај морфолошких карактеристика и експресије рецептора фактора раста у карциному грилића материце“.

Именована је Комисија у слједећем саставу:

Предсједник:

Проф. др Весна Ећим Злојутро

Звање: редовни професор

Ужа научна област: Гинекологија, опстетриција и репродуктивна медицина

Институција: Медицински факултет Универзитет у Бањој Луци

Члан:

Проф. др Ненад Лучић

Звање: редовни професор

Ужа научна област: Гинекологија опстетриција и репродуктивна медицина

Институција: Медицински факултет Универзитет у Бањој Луци

Члан:

Проф. др Небојша Митић

Звање: редовни професор

Ужа научна област: Патологија

Институција: Медицински факултет Универзитет у Косовској Митровици

Након детаљног прегледа урађене докторске дисертације кандидата мр сц. мед. Живорада Гајанина чланови Комисије подносе Наставно-научном вијећу Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци слједећи извјештај:

- 1) Навести датум и орган који је именовао комисију;
- 2) Навести састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, научно-наставног звања, назива у же научне области за коју је изабран у звање и назива универзитета/факултета/института на којем је члан комисије запослен.

## II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1. Живорад (Бошко) Гајанин
2. Рођен 01.07.1959. године у Котор Варошу, Република Српска, Босна и Херцеговина.
3. Универзитет у Бањој Луци Медицински факултет, постипломски студиј Биомедицинска истраживања, магистар медицинских наука.
4. Универзитет у Бањој Луци Медицински факултет, „Експресија п1БИНК4а у инфламацијским, пренеопластичним и неопластичним промјенама цервикса утеруса – клинички значај“, Гинекологија опстетриција и репродуктивна медицина, 26.02.2013.
5. Гинекологија опстетриција и репродуктивна медицина.
6. Кандидат је докторант по Закону о универзитету (стари план и програм).

- 1) Име, име једног родитеља, презиме;
- 2) Датум рођења, општина, држава;
- 3) Назив универзитета и факултета и назив студијског програма академских студија II циклуса, односно послиједипломских магистарских студија и стечено стручно/научно звање;
- 4) Факултет, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране магистарског рада;
- 5) Научна област из које је стечено научно звање магистра наука/академско звање мастерса;
- 6) Година уписа на докторске студије и назив студијског програма.

## III УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов докторске дисертације кандидата мр сц. мед. Живорада Гајанина је: „Прогностички значај морфолошких карактеристика и експресије рецептора фактора раста у карциному грила материце“.

Тема докторске дисертације је прихваћена од стране Наставно-научног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци Одлуком број: 18/3.346/2016 од 11.05.2016. године.

Сенат Универзитета у Бањој Луци је Одлуком бр. 02/04-3.1589-87/16 од 23.06.2016. године дао сагласност на Извјештај о подобности теме за израду докторске дисертације на Медицинском факултету у Бањој Луци кандидата мр сц. мед. Живорада Гајанина под називом „Прогностички значај морфолошких карактеристика и експресије рецептора фактора раста у карциному грила материце“.

Садржај докторске дисертације је изложен у сљедећим поглављима:

1. Увод (стр. 1 – 35),
2. Циљеви истраживања (стр. 36),
3. Пацијентице и методе рада (стр. 37 – 42),
4. Резултати (стр. 43 – 127),
5. Дискусија (стр. 128 – 145),
6. Закључци (стр. 146),
7. Литература (стр. 147 – 160)

Докторска дисертација је написана латиничним писмом, фонтом Times New Roman, величина 12, проред 1,5. Дисертација је написана на укупно 160 старана формата А4. На почетку дисертације налази се 12 страна, које нису нумерисане, а односе се на назив дисертације, резиме (на српском и енглеском језику), захвалница и садржај дисертације. Дисертација садржи 64 табеле и 51 слику. Укупан број литерарних навода је 148.

**У првој целини (стр. 1 – 35)** кандидат је детаљно начинио преглед свих познатих истраживања која су везана за карцином грила материце. Описаны су инциденција, фактори ризика, патофизиологија, начин ширења карцинома грила материце, хистолошки типови према класификацији Свјетске здравствене организације, етиолошки фактори који учествују у настанку карцинома грила материце, клиничка слика и дијагностика болести. Детаљно је приказан начин лијечења, и модалитети лијечења у зависности од стадијума болести и жеље за очувањем фертилности пацијентице. Приказане су и компликације, како од саме болести, тако и од предузетих терапијских процедура.

С обзиром на значај овог карцинома, висок морбидитет и морталитет код жена истакнут је значај у детаљном расвјетљавању патофизиолошких механизама настанка и прогресије тумора, а са жељом изналажења нових циљаних терапијских опција у лијечењу.

Кандидат наглашава да разумијевање молекуларне основе повезане са настанком карцинома грила материце може утицати на рану дијагнозу, развој нових терапијских модалитета и утицати на прогнозу болести. Идентификацијом нових биомаркера ће се омогућити предвиђање прогресије, прогнозе тумора и развој нових циљаних терапијских метода у лијечењу карцинома грила материце. Наведено је да је циљ да се утврде експресија Wnt5A, FLOT2 и ROR 2 карциному грила материце. Такође се наводи да се жели утврдити клинички значај експресије напријед наведених рецептора фактора раста, као и повезаност њихове експресије у туморским ћелијама са другим прогностичким факторима, појавом рецидива болести и укупним преживљавањем пацијентица оболелих од карцинома грила материце.

**У другој целини (стр. 36)** представљени су циљеви истраживања. Циљеви су прецизно постављени. Наведено је да се жели утврдити степен експресије рецептора фактора раста FLOT-2, ROR-2 и Wnt5A у карциному грила материце, повезаност њихове експресије са стандардним морфолошким прогностичким параметрима те њихов утицај на поврат болести и укупно преживљавање.

Такође је у овом дијелу наведена хипотеза истраживања, а која је у складу са постављеним циљевима, те у литератури познатим истраживањима тумора других локализација.

**У трећој целини (стр. 37 – 42)** описаны су пацијентице и методе истраживања. Дефинисани су критеријуми за укључивање у студију, критеријуми за искључивање из студије, дефинисан укупан број пацијентица.

У овом дијелу описане су методе истраживања. Дефинисано је вријеме праћења

пацијентица, подјела пацијентица у групе с обзиром на ток и исход болести. Кандидат је на примјерен начин описао хистолошке методе истраживања, техничко извођење хистолошке и имунохистохемијске обраде, као и интерпретацију хистолошких и имунохистохемијских резултата. У овом дијелу представљене су статистичке методе које су коришћене у обради резултата.

Резултати истраживања су представљени у четвртој целини (стр. 37–42) дисертације. У оквиру овог дијела дисертације су на систематичан начин представљени и документовани резултати истраживања. Приказане су демографске карактеристике пацијентица и утицај на преживљавање, основне морфолошке карактеристике карцинома грлића материце (тип операције, хистолошки тип карцинома грлића материце, хистолошки градус карцинома грлића материце, дубина инвазије строме грлића материце, стадијум карцинома грлића материце по FIGO и ТНМ класификацији, инвазија у лимфне судове, инвазија у крвне судове, статус регионалних лимфних чворова и статус рубова ресекције) и утицај истих на преживљавање. Такође је представљена експресија рецептора фактора раста FLOT-2, ROR-2 и Wnt5A у карциному грлића и утицај на исход и укупно преживљавање пацијентица. Приказане су и тераписке процедуре које су коришћене и утицај на исход болести код пацијентица оболелих од карцинома грлића материце. Приказано је и присуство поврата (релапс) болести и утицај на исход болести. На крају у оквиру резултата су приказане верификоване компликације код пацијентица те укупно преживљавање пацијентица и приказан је Сох-ов модел пропорционалног ризика дејства различитих параметара у анализи пацијентица са карциномом цервикса.

У петој целини (стр. 128–145), написана је дискусија у којој су изнесени резултати истраживања и упоређени са познатим резултатима других аутора. Кандидат на јасан начин дискутује и објашњава оне резултате који нису у сагласности са до сада познатим у литератури или нису у сагласности са резултатима који су добијени истраживањима тумора других локализација (органа). Представљен је и научни допринос овог истраживања, али и наведен опрез приликом интерпретације резултата ове студије с обзиром на високо селектован број пацијентица и студију која је проведена у једном центру.

У шестој целини (стр. 146) изнесени су децидни закључци који су извучени на основу добијених резултата. Закључци су написани јасно, систематично, а кандидат је до истих дошао на основу синтезе научних чињеница изнесених у оквиру дисертације добијених на основу резултата истраживања и статистичких тестирања.

Седма целина (стр. 147 –160) представља списак коришћене литературе у оквиру овог истраживања. Коришћена литература у дисертацији је адекватна, актуелна и обрађује управо истраживања која су проведена на карциному цервикса или других локализација, а која су обухватала истраживања утицаја експресије рецептора фактора раста и њихов утицај на исход малигне болести.

- 1) Наслов докторске дисертације;
- 2) Вријеме и орган који је прихватио тему докторске дисертације
- 3) Садржај докторске дисертације са страничњем;
- 4) Истачи основне податке о докторској дисертацији: обим, број табела, слика, шема, графика, број цитиране литературе и навести поглавља.

#### IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

##### IV 1. Разлог због којих је истраживање предузето, проблем, предмет, циљеви и хипотезе истраживања

У оквиру увода кандидат је изнио сазнања о карциному цервикса од етиологије, патогенезе, клиничке слике, до терапије и прогнозе. С обзиром да је карцином

грила материце и у свијету и код нас значајан узорк морбидитета и морталитета код жена, бројна истраживања покушавају да унаприједе рану дијагностику (дијагностику у фази премалигних лезија или у раним фазама болести), али и унапређење терапијских процедура како би се побољшала прогноза и укупно преживљавање пацијентица које су обольеле од карцинома грила материце. Због свега наведеног постоји потреба да се истраживањем утврде биолошки механизми који утичу на настанак, прогресију и исход лијечења карцинома грила материце. Разумијевање молекуларне основе повезане са настанком карцинома грила материце може утицати на рану дијагнозу, развој нових терапијских модалитета и утицати на прогнозу болести. Идентификацијом нових биомаркера ће се омогућити предвиђање прогресије, прогнозе тумора и развој нових циљаних терапијских метода у лијечењу карцинома грила материце. Кандидат је у истраживању утврдио експресију Wnt5A, FLOT2 и POP 2 у карциному грила материце. Утврдио је значај експресије напријед наведених рецептора фактора раста и повезаност њихове експресије у туморским ћелијама са другим прогностичким факторима, појавом рецидива болести и укупним преживљавањем пацијентица обольелих од карцинома цервикаса.

Основни циљеви истраживања су били:

1. Утврдити стандардне прогностичке параметре и примарни патолошки стадијум болести.
2. Утврдити степен експресије рецептора фактора раста (FLOT2, POP-2 и Wnt5A протеина) у карциному грила материце.
3. Утврдити корелацију између стандардних патохистолошких прогностичких параметара за карцином грила материце, степена експресије рецептора фактора раста.
4. Утврдити који од стандардних патолошких прогностичких параметра и експресија фактора раста утичу на појаву рецидива болести и дужину преживљавања пацијената са карциномом грила материце.

На основу проблема, предмета и циљева истраживања, као и резултата претходних сличних истраживања постављена је хипотеза истраживања која гласи:

1. Карциноми цервикаса са неповољним патохистолошким прогностичким параметрима имају висок степен експресије Wnt5A, FLOT2 и POP 2.
2. Пацијентице са карциномом грила материце које имају високу експресију Wnt5A, FLOT2 и POP 2 имају краће вријеме до појаве рецидива болести и краће преживљавање.

#### **IV 2. Преглед претходних истраживања:**

Карцином грила материце (CC- cervical cancer) је један од најчешћих малигнитета у свијету. На годишњем нивоу оболи 277 000 нових случајева, а умре 266 000 у свијету [1]. По учсталости је трећи по реду од гинеколошких малигнитета послије карцинома оваријума и ендометријума, те чини око 13% свих малигнитета код жена [2]. Инциденција је значајно смањена увођењем обавезних метода скрининга у већини западних земаља. Прогноза болести за операбилне карциноме цервикаса је у посљедњем десетљећу побољшана, а петогодишње преживљавање пацијентица у раним фазама болести је више од 80% [3,4]. Прогноза карцинома цервикаса у узапредованом стадијуму је лоша и петогодишње преживљавање износи око 40% [4]. Сквамоцелуларни карцином је најчешћи хистолошки тип малигног тумора грила материце и чини око 80% до 90% свих тумора овог органа [5]. Хируршка ресекција и радиотерапија су потенцијално куративне методе раних стадијума тумора. Око 30% - 35% тумора се дијагностикује у одмаклом стадијуму, а њихов третман је неуспјешан [6,7]. Рецидив карцинома цервикаса обично има лош одговор на различите модалитетете хемотерапије и радиотерапије [8]. Већина CC настаје од

цервикалне интраепителне неоплазије (CIN), а главни фактор ризика је хронична инфекција хуманим папилома вирусима [9]. Због свега наведеног постоји потреба да се истраживањем утврде биолошки механизми који утичу на настанак, прогресију и исход лијечења карцинома грила материце. Молекуларна патогенеза СС углавном укључује аберантну експресију онкогена и тумор супресорских гена и промјене у сигналним путевима као што су Wnt/β-катенин, мTOP, Нотч путеви [10]. Тачни ћелијски механизми карциногенезе у СС су још увијек слабо разјашњени. Wnt сигнални пут укључује бројне протеине који су потребни за почетак процеса ћелијске пролиферације и диференцијације у различитим органима [11]. Активација овог пута започиње везивањем протеина за ванћелијску домену рецептора коју чине шест трансмембраних протеина припадника Г-протеин везаних рецептора. Након њихове активације креће каскадна реакција унутар ћелије, а која завршава пролиферацијом ћелије. Постоје докази да Wnt сигнални пут игра важну улогу у карциногенези и напредовању тумора. Активација Wnt сигнализације може увести туморску ћелију у пролиферацију и миграцију, док супресија овог пута може довести до инхибиције раста тумора. Такође активација Wnt сигналног пута може указивати на хемосензитивност и радиорезистентност тумора [7,12,13,14]. Трајна активација Wnt-β-катенина указује на лошу прогнозу неколико карцинома [15].

FLOT2 је протеин који припада СПФХ фамилији протеина, и представља рецептор за факторе (раст) који су повезани са преносом сигнала у ћелији. Присутан је у различитим ткивима (мозак, срце, плућа и плацента) и повезан је са различитим типовима хуманих карцинома [16,17]. Нека од истраживања указују да експресија FLOT2 указује на лошу прогнозу и појаву метастаза СС [18]. Такође, истраживања указују и на повезаност експресије FLOT2 и појаве метастаза у меланому [19], лошија прогноза у карциному желуца [20], лоша прогноза и брза прогресија у карциному бубрега [21]. Међутим, улога FLOT2 у прогресији и предвиђању исхода СС још увијек није позната.

Рецептор сличан тирозин киназном рецептору, *orphan 2* рецептор (ROR2), познат као неутрофна тирозин киназа, припада POP фамилији рецептора који се налазе на површини ћелије. ROR2 су укључени у формирање хрскавице и његова нормална активност је потребна за развој и раст хрскавице [22,23,24]. Недавна истраживања указују да мутације у ROR2 гену могу бити узорок настанка тумора. Wright и сарадници су доказали да је експресија ROR2 у корелацији са експресијом гена укључених у продукцију екстрацелуларног матрикса, те да стимулише раст тумора поријекла бubrežних ћелија [25,26]. Аутори су утврдили улогу експресије ROR2 рецептора и у карциному дебелог цријева [27]. Edris и сарадници су утврдили да је експресија ROR2 рецептора значајан прогностички фактор у малигним туморима меких ткива (саркомима) [28]. Клинички значај експресије ROR2 рецептора у карциномима цервикаса и повезаност експресије са другим прогностичким параметрима још увијек није у потпуности јасан.

Разумијевање молекуларне основе повезане са настанком СС може утицати на рану дијагнозу, развој нових терапијских модалитета и утицати на прогнозу болести [10]. Идентификацијом нових биомаркера ће се омогућити предвиђање прогресије, прогнозе тумора и развој нових циљаних терапијских метода у лијечењу ЦЦ [22].

#### Литература цитирана у IV 2.

1. Sahasrabuddhe VV, Parham GP, Mwanahamuntu MH and Vermund SH. Cervical cancer prevention in low- and middle-income countries: feasible, affordable, essential. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5: 11-17.
2. Colombo N, Carinelli S, Colombo A, Marini C, Rollo D, Sessa C. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*

- 2012; 23 Suppl 7: vii27-32.
3. Landoni F, Maneo A, Colombo A, Placa F, Milani R, Perego P, Favini G, Ferri L and Mangioni C. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet* 1997; 350: 535-540.
  4. Arbyn M, Castellsague X, de Sanjose S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, Ferlay J. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol* 2011; 22: 2675-2686.
  5. Jemal A, Bray F, Forman D, O'Brien M, Ferlay J, Center M, Parkin DM. Cancer burden in Africa and opportunities for prevention. *Cancer* 2012; 118: 4372-4384.
  6. Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet* 2003; 361: 2217-2225.
  7. Lin L, Liu Y, Zha W, Sun B, Chen Q. Wnt5A expression is associated with the tumor metastasis and clinical survival in cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(9):6072-6078.
  8. Vici P, Mariani L, Pizzuti L, Sergi D, Di Lauro L, Vizza E, Tomao F, Tomao S, Mancini E, Vincenzoni C, Barba M, Maugeri-Sacca M, Giovinazzo G and Venuti A. Emerging biological treatments for uterine cervical carcinoma. *J Cancer* 2014; 5: 86-97.
  9. Huang QT, Zhong M, Gao YF, Huang LP, Huang Q, Wang W, Wang ZJ and Yu YH. Can HPV vaccine have other health benefits more than cancer prevention? A systematic review of association between cervical HPV infection and preterm birth. *J Clin Virol* 2014; 61: 321-328.
  10. Zagouri F, Sergentanis TN, Chrysikos D, Filipits M and Bartsch R. Molecularly targeted therapies in cervical cancer. A systematic review. *Gynecol Oncol* 2012; 126: 291-303.
  11. Lyuksyutova AI, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier-Lavigne M and Zou Y. Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 2003; 302: 1984-1988.
  12. Ramachandran I, Ganapathy V, Gillies E, Fonseca I, Sureban SM, Houchen CW, Reis A and Queimado L. Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1246.
  13. Lu W, and Li Y. Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/beta-catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 2014; 115: 1799-807.
  14. Kim Y, Kim KH, Lee J, Lee YA, Kim M, Lee SJ, Park K, Yang H, Jin J, Joo KM and Nam DH. Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Lab Invest* 2012; 92: 466-473.
  15. Hu T and Li C. Convergence between Wnt-beta-catenin and EGFR signaling in cancer. *Mol Cancer* 2010; 9: 236.
  16. Liu Y, Lin L, Huang Z, Ji B, Mei S, Lin Y, Shen Z. High expression of flotillin-2 is associated with poor clinical survival in cervical carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(1):622-628.
  17. Banning A, Ockenga W, Finger F, Siebrasse P and Tikkanen R. Transcriptional regulation of flotillins by the extracellularly regulated kinases and retinoid X receptor complexes. *PLoS One* 2012; 7: e45514.
  18. Rickman DS, Millon R, De Reynies A, Thomas E, Wasyluk C, Muller D, Abecassis J and Wasyluk B. Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays. *Oncogene* 2008; 27: 6607-6622.
  19. Hazarika P, McCarty MF, Prieto VG, George S, Babu D, Koul D, Bar-Eli M and Duvic M. Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1. *Cancer Res* 2004; 64: 7361-7369.
  20. Zhu Z, Wang J, Sun Z, Sun X, Wang Z and Xu H. Flotillin2 expression correlates with

- HER2 levels and poor prognosis in gastric cancer. PLoS One 2013; 8: e62365.
21. Yan Y, Yang FQ, Zhang HM, Che J and Zheng JH. Up-regulation of flotillin-2 is associated with renal cell carcinoma progression. Tumour Biol 2014; 35: 10479-10486.
22. Bo Sun1, Xiufeng Ye1, Li Lin1, Mei Shen2, Taotao Jiang2. Up-regulation of ROR2 is associated with unfavorable prognosis and tumor progression in cervical cancer. Int J Clin Exp Pathol 2015;8(1):856-861.
23. Masiakowski P , Carroll RD. A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. J Biol Chem 1992; 267: 26181-26190.
24. Oldridge M, Fortuna AM, Maringa M, Propping P, Mansour S, Pollitt C, DeChiara TM, Kimble RB, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Wilkie AO. Dominant mutations in ROR2, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. Nat Genet 2000; 24: 275-278.
25. Wright TM, Brannon AR, Gordan JD, Mikels AJ, Mitchell C, Chen S, Espinosa I, van de Rijn M, Pruthi R, Wallen E, Edwards L, Nusse R, Rathmell WK. Ror2, a developmentally regulated kinase, promotes tumor growth potential in renal cell carcinoma. Oncogene 2009; 28: 2513-2523.
26. Rasmussen NR, Wright TM, Brooks SA, Hacker KE, Debebe Z, Sendor AB, Walker MP, Major MB, Green J, Wahl GM, Rathmell WK. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (Ror2) expression creates a poised state of Wnt signaling in renal cancer. J Biol Chem 2013; 288: 26301-26310.
27. Lara E, Calvanese V, Huidobro C, Fernandez AF, Moncada-Pazos A, Obaya AJ, Aguilera O, Gonzalez-Sancho JM, Sanchez L, Astudillo A, Munoz A, Lopez-Otin C, Esteller M, Fraga MF. Epigenetic repression of ROR2 has a Wnt-mediated, protumourigenic role in colon cancer. Mol Cancer 2010; 9: 170.
28. Edris B, Espinosa I, Muhlenberg T, Mikels A, Lee CH, Steigen SE, Zhu S, Montgomery KD, Lazar AJ, Lev D, Fletcher JA, Beck AH, West RB, Nusse R, van de Rijn M. ROR2 is a novel prognostic biomarker and a potential therapeutic target in leiomyosarcoma and gastrointestinal stromal tumour. J Pathol 2012; 227: 223- 233.

#### **IV 3. Допринос тезе у рјешавању изучаваног проблема истраживања**

У овом истраживању аутор је доказао да се карцином грила материце најчешће дијагностикује у доби од 40 – 60 година старости. Најчешће карактеристике карцинома су: сквамоцелуларни хистолошки тип, умјереног степена диференцијације, са дубином инвазије строме преко 5 mm, у стадијуму FIGO IB1, са инвазијом у лимфне судове и честим метастазама у регионалне лимфне чворове. Експресија испитиваних фактора раста FLOT2, Wnt5A и ROR2 најчешће је била присутна и високог интензитета. Петогодишње преживљавање пацијентица у студији коју је кандидат провео је износило 70,8%. На дужину преживљавања у овом истраживању су утицали сљедећи фактори: тип хируршке интервенције, FIGO стадијум болести, pTNM стадијум болести, инвазија лимфних судова, инвазија крвних судова, број метастатских лимрних чворова, експресија FLOT2 у туморским ћелијама, примјењене врсте терапије и поврата (релапс) болести.

#### **IV 4. Научни и прагматични допринос дисертације**

Аутор наглашава да су до сада су проведена истраживања која се тичу значаја експресије receptora фактора раста (FLOT2, Wnt5A и ROR2) у туморима других локализација. Истраживања нису проведена на узорцима карцинома грила материце. Основни значај који је истакнут је да је експресија наведених фактора раста у туморским ћелијама присутна у великој већини случајева, и да је високог интензитета. Истакнуто је да експресија FLOT2 утиче на појаву релапса болести и дужину преживљавања, а експресија Wnt5A и ROR2 не утичу на дужину

преживљавања у испитиваном узорку.

Резултате истраживања треба интерпретирати са опрезом, с обзиром да се ради о истраживању у оквиру једне институције, као и о томе да се ради о малом, селектованом узорку (узорак су чиниле пацијентице које су биле операбилне у вријеме дијагностиковања болести). Напоре за утврђивање специфичних "мета" на које би дјеловала терапијска средства треба наставити и интензивирати, с обзиром на значај у морбидитету и морталитету од карцинома грилића материце.

- 1) Укратко истаћи разлог због којих су истраживања предузета и представити проблем, предмет, циљеве и хипотезе;
- 2) На основу прегледа литературе сажето приказати резултате претходних истраживања у вези проблема који је истраживан (водити рачуна да обухвата најновија и најзначајнија сазнања из те области код нас и у свијету);
- 3) Навести допринос тезе у рјешавању изучаваног предмета истраживања;
- 4) Навести очекиване научне и прагматичне доприносе дисертације.

## V МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

### Материјал и критеријуми

Пацијентице и методе рада које су коришћене у овој докторској дисертацији су усклађене са постављеним циљевима и приказане су на шет страница. Коришћени материјал (узорци) и метод истраживања омогућили су увид у посматрани проблем и пружили научни одговор на постављене циљеве односно предмет истраживања.

Истраживање је укључило 101 пацијентицу код које је дијагностикован карцином цервикаса и који је хируршки лијечен у Универзитетском Клиничком центру Републике Српске (УКЦ РС). Критеријуми за укуључење у студију били су:

1. Пацијентице оболјеле од карцинома грилића материце;
2. У лијечењу карцинома грилића материце је коришћена хируршка терапија;
3. Постоје подаци о току и исходу болести код пацијентица.

Критеријуми за искључење из студије били су:

1. Пацијентице које не болују од карцинома грилића материце;
2. Непостојање репрезентативних узорака за хистолошку и имунохистохемијску анализу;
3. Пацијентице које у лијечењу карцинома нису хируршки третиране;
4. Недосатак података за ток и исход болести.

### V 2. Кратак увод у метод истраживања

Праћење болесника: ток и исход лијечења, дужина преживљавања и узрок смрти утврђени су на основу медицинске документације и података добијених интервјуом са пацијентицом или њеном породицом.

Пацијентице су на основу тока и исхода болести подијељене у двије групе:

група I- пацијентице са повољним исходом болести (у току периода праћења живе, без рецидива болести);

група II- пацијентице са неповољним исходом болести:

1. живе, са релапсом болести у току праћења,
2. пацијентице умрле у току праћења.

Подаци о старости, као и подаци о макроскопским карактеристикама тумора, локализација тумора, макроскопски тип раста тумора и други подаци су преузети из патохистолошких налаза уложених у регистре пацијената.

На материјалима који су добијени током хируршке интервенције урађена је стандардна хистолошка обрада узорака и извршена дефинитивна дијагностика и интерпретација свих прогностичких параметра предвиђених за карцином грила материце. Одређивани су слједећи параметри неповољне прогнозе: хируршка процедура која је коришћена у лијечењу, величина тумора, хистолошки тип тумора (према класификацији Свјетске здравствене организације – CZO), хистолошки градус тумора, дубина инвазије строме, начин раста, маргине (ендоцервикална код парцијалних ресекција цервикса), егзоцервикална–вагинална, дубока циркумференцијална маргина), инвазија лимфних судова, инвазија крвних судова, перинеурална и интранеурална инвазија, статус лимфних чворова, патолошки садијум болести (pTНM), друге промјене.

На основу рутинских ХЕ препарата одабрани су и узорци туморског ткива који су у слједећем кораку хистолошке анализе коришћени за имунохистохемијско бојење. За имунохистохемијску анализу одабрани парафински блокови су додатно резани на танке пресјеке дебљине 2 - 4 μm. Након тога урађена је стандардна имунохистохемијска анализа уз коришћење антитијела анти-FLOT2, анти-Wnt5A и анти-ROR2.

За одређивање степена имунохистохемијске експресије коришћен је семиквантитативни систем оцјењивања који је укључивао интензитет имунобојења и проценат ћелија које су имале сигурну позитивну имуноколорацију (реакцију). Систем оцјењивања је дизајниран како би одговарао потребама студије.

Сви испитивани параметри и коришћене методе пружају довољно елемената да ово истраживање учине квалитетним.

Статистичка обрада је била адекватна. Добијени подаци су обрађени према основним дескриптивним статистичким методама: средња вриједност, стандардна девијација и медијана, за нумеричка обиљежја. За обиљежја дисконтинуиране природе је коришћена учсталост и градација позитивности по аналогној скали. Разлике између група по анализираним варијаблама су тестиране параметарском аналитичком статистичком методом - Студентовим t тестом за независне узорке. За непараметријска обиљежја и процјену утицаја варијабли на прогресију болести, примјењиване су аналитичке методе за процјену значајности разлике: Pearson-ов  $\chi^2$  тест и Фишеров тест тачне вјероватноће. Испитивање вјероватноће преживљавања и утицаја поједињих варијабли на преживљавање болесница је рачунато према Kaplan-Maierовом алгоритму. За универзално поређење кривих преживљавања између поједињих група и категорија анализираних варијабли коришћен је  $\chi^2$  тест и Long-rank тест.

Мултиваријантна анализа у неколико изабраних модела је урађена примјеном Соховог модела пропорционалних хазарда. Сви подаци су унијети у табеле и приказани графички. У случају кад је вјероватноћа да је нулта хипотеза тачна једнака или мања од 5% ( $p \leq 0,05$ ) разлика између анализираних група је прихваћена као статистички значајна, а када је вјероватноћа једнака или мања од 1% ( $p \leq 0,01$ ) разлика између анализираних група је прихваћена као високо статистички значајна. У статистичкој обради података коришћен је компјутерски програм SPSS v.16 (SPSS, Chicago, IL, USA).

- 1) Објаснити материјал који је обрађиван, критеријуме који су узети у обзир за избор материјала;
- 2) Дати кратак увид у примијењени метод истраживања при чemu је важно оцијенити слједеће:
  1. Да ли су примијењене методе истраживања адекватне, довољно тачне и савремене, имајући у виду достигнућа на том пољу у свјетским нивоима;
  2. Да ли је дошло до промјене у односу на план истраживања који је дат приликом пријаве докторске тезе, ако јесте зашто;
  3. Да ли испитивани параметри дају довољно елемената или је требало испитивати још неке, за поуздано истраживање;

4. Да ли је статистичка обрада података адекватна.

## VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

### **VI 1. Резултати истраживања**

Резултати ове докторске дисертације су написани на 85 страница, а анализирани су у дискусији на 18 страница. Кандидат у првом дијелу резултата представља демографске карактеристике пацијентица које су укључене у студију, те утицај демографских карактеристика на преживљавање. Констатовао је да је медијана појаве карцинома цервикса 51 година, а доб у којима се најчешће дијагностикује је од 40 до 60 година. Статистичким тестирањем није добијена статистички значајна разлика у преживљавању.

У сљедећем дијелу кандидат је на детаљан начин представио морфолошке карактеристике карцинома код пацијентица које су укључене у студију. Такође врши испитивање утицаја поједињих морфолошких карактеристика на преживљавање и појаву рецидива болести. Представљени су сљедећи морфолошки параметри и утицај истих на преживљавање: тип оперативног захвата, врста материјала на којем је вршена анализа, хистолошки тип карцинома, хистолошки градус тумора, дубина инвазије строме цервикса, FIGO и пTNM стадијум тумора, инвазија у лимфне судове, инвазија у крвне судове, анализа регионалних лимфних чворова, статус рубова ресекције, анализа експресије фактора раста FLOT2, Wnt5A и ROR2. Такође, анализиран је утицај примјењене терапијске опције на прогнозу, појаву рецидива и укупно преживљавање пацијентица са карциномом цервикса. Резултати су на адекватан начин документовани, и критички дискутовани у поглављу дискусија. Кандидат је на логичан и јасан начин дискутовао резултате и упоредио их са познатим у медицинској литератури. Кандидат наводи и ограничења ове студије, а која се прије свега односе на истраживања која су проведена у једној установи, али и истраживање које је проведено на релативно малом броју пацијентица.

На основу резултата кандидат је извео сљедеће закључке:

1. Карцином цервикса најчешће се дијагностикује код жена старости од 40 до 60 година.
2. Најчешћи тип операције је био радикална хистеректомија са пелвичном лимфадектомијом (97% случајева).
3. Инвазивни сквамоцелуларни карцином је дијагностикован у 92% случајева, умјереног степена диференцијације у 74,3%, са дубином инвазије строме цервикса >5мм код 90% пацијентица, у стадијуму FIGO IB1 код 53,5% пацијентица. Инвазија у лимфне судове је утврђена код 57,4% пацијентица, у крвне судове код 15,8%, са метастазама у лимфне чворове код 37% испитаница, а позитивни рубови ресекције су уочени код 4,5 % пацијентица.
4. Експресија фактора раста у туморским ћелијама је најчешће је била присутна и високог интензитета: FLOT2 у 81,2% случајева, Wnt5A у 70,3% случајева, ROR2 у 62,4% случајева.
5. Преживљавање пацијентица обольелих од карцинома грлића материце након пет година праћења у нашој студији је било 70,8%.
6. На дужину преживљавања у нашем истраживању су утицали: тип хируршке интервенције, FIGO стадијум болесту, пTNM стадијум болести, инвазија лимфних судова, инвазија крвних судова, број метастатских лимрних чворова, експресија FLOT2 у туморским ћелијама, примјењене врсте терапије и поврат (релапс) болести.
7. Као независни прогностички фактори у нашем истраживању су се показали: инвазија у лимфне судове, инвазија у крвне судове, метастатски измјењени лимфни чворови и експресије FLOT2 у туморским ћелијама.

## VI 2. Критичност и коректност тумачења резултата

Резултати истраживања су јасно приказани, прегледно презентован и објективно тумачени. Кандидат је у докторској дисертацији показао објективан и критичан став у анализи резултата, посебно у дијелу који се односи на компарацију резултата са резултатима сличних досадашњих истраживања. Дискусија резултата показује способност у прикупљању, анализи и прегледној презентацији резултата, као и да на јасан и свеобухватан начин приступи компарацији добијених резултата са литературним подацима.

## VI 3. Теоријски и практични допринос дисертације и нови истраживачки задаци

*Основни теоријски допринос дисертације је следећи:*

Ова докторска дисертација проширује постојећа сазнања о карциному цервикса, прије свега о утицају стандардних морфолошких прогностичких параметара на преживљавање пацијената, поврат болести и прогнозу. Резултати добијени у овој дисертацији који се односе на експресију фактора раста се разликују од резултата које су добили други аутори испитујући експресију истих рецептора на туморима других органа. Значајно је напоменути да је експресија FLOT2 повезана са лошом прогнозом код пацијентица које су обольеле од карионома цервикса, док експресија Wnt5A и ROR2 није имала утицај на прогнозу и преживљавање у истраживању које је проведено у оквиру ове докторске дисертације.

*Основни практични допринос дисертације је следећи:*

На основу истраживања која су проведена у оквиру ове дисертације може се рећи да у практичном смислу резултати имају велики значај. Између осталог се издваја значај у предвиђању прогнозе за болеснице обольеле од карцинома цервикса. На прогнозу и укупно преживљавање утичу следеће карактеристике тумора: тип хируршке интервенције, FIGO стадијум болести, pTNM стадијум болести, инвазија лимфних судова, инвазија крвних судова, број метастатских лимфних чворова, експресија FLOT2 у туморским ћелијама, примјењене врсте терапије и поврат (релапс) болести.

*Основни правци даљих истраживања:*

Резултати ове докторске дисертације дају одговоре на постављени проблем истраживања, али и указују на будуће правце истраживања патогенезе карцинома грила материце, те утврђивање специфичних "мета" на које би дјеловала терапијска средства. Оваква истраживања треба наставити и интензивирати, с обзиром на значај у морбидитету и морталитету од карцинома грила материце.

- 1) Укратко навести резултате до којих је кандидат дошао;
- 2) Оцијенити да ли су добијени резултати јасно приказани, правилно, логично и јасно тумачени, упоређујући са резултатима других аутора и да ли је кандидат при томе испољавао довољно критичности;
- 3) Посебно је важно истаћи до којих нових сазнања се дошло у истраживању, који је њихов теоријски и практични допринос, као и који нови истраживачки задаци се на основу њих могу утврдити или назирати.

## VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

Докторска дисертација под називом „Прогностички значај морфолошких карактеристика и експресије рецептора фактора раста у карциному грила материце“ mr sci. Живорада Гајанина урађена је у складу са образложењем које је кандидат приложио приликом пријаве теме.

Докторска дисертација је урађена према правилима и принципима научноистраживачког рада и резултат је оригиналног научног рада кандидата.

Резултати овог истраживања су указали да на прогнозу карцинома цервикса имају утицај неке морфолошке карактеристике тумора као што су: тип хируршке интервенције, FIGO стадијум болести, пTNM стадијум болести, инвазија лимфних судова, инвазија крвних судова, број метастатских лимфних чворова, експресија FLOT2 у туморским ћелијама, примјењене врсте терапије и поврат (релапс) болести.

Кандидат је такође дао и оквир за будућа истраживања, а која се односе на патогенезу и изналажење других терапијских мета које би могле утицати на прогнозу овог малигнитета.

Предложена тема је прецизно и логично анализирана, а подаци су доведени у везу са постављеном хипотезом. Такође, кандидат је тему дисертације учинио интересантном, како за истраживаче, тако и за практичаре.

Дисертација представља оригинални допринос медицинској науци. Истраживања овог типа нису провођена у доступној литератури. Кандидат је први који је испитивао експресију рецептора фактора раста FLOT2, Wnt5A и ROR2 у карциному цервикса, те анализирао њихов утицај на прогнозу болести.

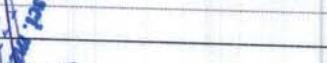
Чланови Комисије, на основу укупне оцјене докторске дисертације једногласно дају позитивну оцјену о завршеној докторској дисертацији под називом: „Прогностички значај морфолошких карактеристика и експресије рецептора фактора раста у карциному грила материце“ mr sc. Живорада Гајанина и предлажу члановима Наставно-научног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци да прихвате овај извјештај и омогуће кандидату да своју докторску дисертацију јавно брани.

- 1) Навести најзначајније чињенице што тези даје научну вриједност, ако исте постоје дати позитивну вриједност самој тези;
- 2) На основу укупне оцјене дисертације комисија предлаже:
  - да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана,
  - да се докторска дисертација враћа кандидату на дораду (да се допуни или измијени) или
  - да се докторска дисертација одбија.

У Бањој Луци

22. 06. 2020.

#### ПОТПИС ЧЛНОВА КОМИСИЈЕ

1.   
Проф. др Весна Ерић Злојутро, предсједник
2.   
Проф. др Ненад Лукић, члан
3.   
Проф. др Небојша Митић, члан

**ИЗДВОЈЕНО МИШЉЕЊЕ:** Члан комисије који не жeli да потпише извјештај јер сe не слажe сa мишљењем већине чланова комисије, дужан јe да унесe у извјештај обrazloženje, односно разлог збog коjih ne жeli da потпиše извјешtaj.