

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Naučno veće Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na sednici održanoj 30.04.2009. g. odredilo je članove komisije za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom: **“Prognostički značaj određivanja serumskog vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (s – VEGF) u pacijenata sa difuznim krupnoćelijskim B non – Hočkinskim limfomom”** – mentor disertacije je Prof. dr. sci. med. Milan Petrović.

U komisiju su imenovani:

1. Prof. dr. sci. med. Biljana Mihaljević,
2. Prof. dr. sci. med. Svetislav Tatić,
3. Prof. dr. sci. med. Svetislav Jelić

Članovi komisije su proučili priloženu disertaciju i podnose Naučnom veću sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija dr. Nenada Milanovića: “Prognostički značaj određivanja serumskog vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (s – VEGF) u pacijenata sa difuznim krupnoćelijskim B non – Hočkinskim limfomom”, napisana je na 95 stranica A4 formata. Disertacija se sastoji od 7 poglavlja: **uvod, ciljevi ispitivanja, metodologija ispitivanja, rezultati ispitivanja, diskusija, zaključci i literatura** sa 41. citatom. Disertacija sadrži 28 tabela i 18 grafikona kao i popis skraćenica korišćenih u tekstu i sažetak na srpskom i engleskom jeziku.

Uvod je napisan na 28 strana i sastoji se od 9 podpoglavlja. U prvom podpoglavlju se definiše pojam angiogeneze, u drugom se razmatra regulacija fiziološke angiogeneze sa razmatranjem učešća svih navedenih faktora angiogeneze, u trećem podpoglavlju se pažnja fokusira na vaskularni endotelijalni faktor rasta (s – VEGF) kao na jednog od ključnih regulatora fiziološke angiogeneze sa razmatranjem njegovih tipova, izoformi, receptora, intracelularnih puteva prenosa signala i učešću u blokiranoj procesi apoptoze. U četvrtom podpoglavlju se razmatra patološka, tumorska angiogeneza, faze u razvoju tumorske vaskulature i genetska kontrola ovog procesa, kao i uloga VEGF - a . Peto podpoglavlje razmatra tumorsku angiogenezu u hematološkim malignitetima izučavanog na modelu multiplog mijeloma, uloga VEGF – a i interakcije VEGF – a sa ostalim faktorima angiogeneze, fibroblastnim faktorom rasta i matriksnim metaloproteinazama. Šesto podpoglavlje sagledava non Hočkinske limfome i njihove etiološke i epidemiološke karakteristike, dok je u sedmom fokus na jednom od najčešćih tipova non Hočkinskih limfoma – difuznom krupnoćelijskom B limfomu u svetlu nove klasifikacije Svetske zdravstvene organizacije (WHO). U osmom podpoglavlju se definišu kliničke, patohistološke i molekularne karakteristike difuznog krupnoćelijskog B limfoma. U

devetom se razmatra prognoza ovog tipa limfoma i daje se detaljan prikaz prognostičkih parametara i prognostičkih modela koji su danas aktuelni, kao i terapijski pristupi u zavisnosti od stadijuma bolesti i pripadnosti prognostičkim kategorijama bolesti.

Ciljevi ispitivanja su jasno postavljeni.

Ispitivan je nivo pretretmanske vrednosti serumskog vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (s – VEGF) koji je određivan u homogenoj grupi pacijenata sa dijagnozom difuznog krupnoćelijskog B limfoma sa utvrđivanjem relacija vrednosti ovog faktora i : odgovora na primenjenu terapiju, trajanja terapijskog odgovora, vremena do progresije i ukupnog preživljavanja.

Takodje je ispitivana povezanost nivoa pretretmanske vrednosti serumskog vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (s – VEGF) i :

tumorskog volumena bolesti, vrednosti pojedinih ćelijskih elemenata krvi, serumskih nivoa laktičke dehidrogenaze (LDH) i beta 2 mikroglobulina (B2M), drugih kliničkih i bioloških faktora prognoze karakterističnih za agresivne non Hočkinske limfome.

U poglavlju **metodologija ispitivanja**, u podpoglavlju **pacijenti** definisan je karakter studije (prospektivno ispitivanje) kao i kriterijumi na osnovu kojih su pacijenti uključivani u studiju (histopatološki nalaz, dob, stadijum bolesti, razvrstavanje po prognostičkim kategorijama, terapijski pristup), kao i vremenski interval praćenja pacijenata. U podpoglavlju **metode** navedena je tehnička procedura prikupljanja, obrade i odlaganja uzoraka serumskog vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (s – VEGF), laktičke dehidrogenaze (LDH) i beta 2 mikroglobulina (B2M) pre otpočinjanja lečenja.

Definisani su takodje standardni kriterijumi procene terapijskog odgovora kao i kriterijumi za dužinu trajanja vremena do progresije, trajanja terapijskog odgovora i ukupnog preživljavanje.

Poseban deo metodologije ispitivanja je statistička metodologija. Za testiranje razlika u postignutom efektu terapije u zavisnosti od definisanih prognostičkih faktora korišćeni su: hi kvadrat test, Fisher exact test, Mc Nemar test, Wilcoxon signet – ranks test, Mann – Whitney – U – test, t – test. Za prikaz krivih ukupnog preživljavanja u zavisnosti od prognostičkih faktora korišćeni su: Kaplan – Meier product – limit metoda, za testiranje u ukupnom preživljavanju korišćen je Log – rank test.

Rezultati predstavljaju najveće poglavlje disertacije (35 strana) i podeljeno je u 7 delova :

1. karakteristike pacijenata (ukupno 50 pacijenata) – kliničke karakteristike, odgovor na terapiju, ukupno preživljavanje, vreme do progresije, trajanje terapijskog odgovora ,
2. korelacije serumskog nivoa VEGF – a iznad i ispod vrednosti medijane i pomenutih parametara (odgovora na terapiju, ukupnog preživljavanja, vremena do progresije, trajanja terapijskog odgovora) i odnos vrednosti s - VEGF - a podeljenog po kvantilima i ukupnog preživljavanja,
3. odnos serumskog nivoa VEGF – a i tumorskog volumena bolesti sa uticajem na terapijski odgovor i ukupno preživljavanje,
4. odnos serumskog nivoa VEGF – a i vrednosti ćelijskih elemenata periferne krvi (monocita i trombocita) sa uticajem na ukupno preživljavanje, trajanje terapijskog odgovora i vreme do progresije,

5. odnosi nivoa serumskog nivoa VEGF – a i serumskih vrednosti laktične dehidrogenaze (LDH) i beta 2 mikroglobulina (B2M), u okviru definisanog Solubilnog Sistema Stadiranja (SSS) limfomskih pacijenata, kao i odnos formiranih kategorija SSS i odgovora na terapiju i ukupnog preživljavanja,
6. odnosi nivoa serumskog nivoa VEGF – a i drugih prognostičkih sistema (IPI) limfomskih pacijenata, odnos formiranih kategorija i odgovora na terapiju, trajanja terapijskog odgovora, vremena do progresije i ukupnog preživljavanja,
7. odnosi nivoa serumskog nivoa VEGF – a i klirensa kreatinina (uticaj ekskretorne bubrežne funkcije na nivo s – VEGF – a).

Diskusija je napisana na 19 strana i sastoji se od 5 podpoglavlja. Diskutuju se po podpoglavljima uticaji nivoa serumskog nivoa VEGF – a i parametara ishoda lečenja (odgovor na terapiju) i preživljavanja pacijenata (vreme do progresije, trajanje terapijskog odgovora i ukupno preživljavanje), kao i uticaj nivoa serumskog nivoa VEGF – a i tumorskog volumena, vrednosti pojedinih ćelijskih elemenata periferne krvi, laktične dehidrogenaze (LDH) i beta 2 mikroglobulina (B2M), drugih kliničkih parametara prognoze, a u svetlu poznatih literaturnih podataka.

Zaključci su navedeni u 10 tačaka na dve stranice, jasno je odgovoreno na postavljene ciljeve.

B. Kratak opis postignutih rezultata

U ovoj studiji je obradjena homogena grupa od pedeset pacijenata sa dijagnozom novodijagnostikovanih uznapredovalih limfoma difuznog krupnoćelijskog B tipa koji su lečeni i praćeni u Institutu za Onkologiju i Radiologiju Srbije u periodu od marta 2006.g. do avgusta 2008.g.

U ovom istraživanju je 58% pacijenata pripadalo uznapredovalim kliničkim stadijumima bolesti (Ann Arbor CS III i IV), od toga 86% pacijenata je lečeno sa polihemioterapijskim protokolom CHOP u kombinaciji sa anti CD 20 monoklonalnim antitelom – Rituximab.

Ukupno 37/50 (74%) pacijenata je odgovorilo na primenjenu terapiju, od toga je 62% (31/50) pacijenata imalo kompletan klinički odgovor, dok su 3/50 (6%) pacijenta su primili samo jedan ciklus terapije, te njihov terapijski odgovor nije bilo moguće proceniti. Kriva preživljavanja za celu ispitivanu grupu (n=50) je pokazala medijanu preživljavanja koja nije dostignuta (0.95CI: 15-inf).

Prikazana je kriva vremena do progresije u ispitivanoj grupi (n=40) sa medijanom koja takodje nije dostignuta (0.95CI: 24-inf), a kriva trajanja terapijskog odgovora u ispitivanoj grupi (n=37) sa medijanom od 18 meseci (0.95CI: 4-29).

Parametar od značaja za istraživanje u ovom radu bio je nivo serumskog VEGF (jedinica mere: pg/ml). U posmatranom uzorku, njegove vrednosti su se kretale u opsegu od 15,0 – 1009,5 pg/ml, sa medijanom od 111.68 pg/ml.

Za ovu studiju je od interesa bilo ispitivanje sledećih kategorija pacijenata:

$VEGF_1$ – kategorija pacijenata sa vrednostima $VEGF < 111,68$ pg/ml,

$VEGF_2$ – kategorija pacijenata sa vrednostima $VEGF \geq 111,68$ pg/ml.

U grupi $VEGF_1$ bilo je statistički značajno više pacijenata sa kompletnim odgovorom (CR) 20/50 (80%) u odnosu na $VEGF_2$ 11/50 (44%) (Person χ^2 -Test: $\chi^2_1=4,691$; $p=0,030$).

Što se tiče ukupnog terapijskog odgovora (CR + PR) između posmatranih grupa nema statistički značajne razlike u frekventnosti ispitivanih kategorija odgovora 21/50 (84%) vs. 16/50 (64%), (Fisher Exact Test; $p=0,479$).

Medijana preživljavanja u grupi $VEGF_1$ nije dostignuta te se ni odgovarajući 95% CI nije mogao proceniti a u grupi $VEGF_2$ medijana preživljavanja sa 95%CI iznosila je 15 meseci (8-inf), tako da su pacijenti grupe $VEGF_1$ imali statistički značajno bolje preživljavanje u odnosu na pacijente iz grupe $VEGF_2$ (Log Rank test; $\chi^2_1=4,015$; $p=0,045$).

Medijana vremena do progresije u grupi $VEGF_1$ nije dostignuta dok je odgovarajući 95% CI (24-inf). U grupi $VEGF_2$ medijana vremena do progresije sa 95%CI iznosi 23 (8-inf). Pacijenti grupe $VEGF_1$ imaju statistički značajno bolje vreme do progresije bolesti u odnosu na pacijente iz grupe $VEGF_2$ (Log Rank test; $\chi^2_1=6,245$; $p=0,012$).

Medijana trajanja kompletnog terapijskog odgovora (CR) u grupi $VEGF_1$ nije dostignuta dok je odgovarajući 95% CI (24-inf). U grupi $VEGF_2$ medijana trajanja kompletnog terapijskog odgovora (CR) takođe nije dostignuta dok je odgovarajući 95%CI (15-inf).

Pacijenti grupe $VEGF_1$ se ne razlikuju statistički značajno u odnosu na pacijente iz grupe $VEGF_2$ po trajanju kompletnog i parcijalnog terapijskog odgovora (CR + PR) (Log Rank test; $\chi^2_1=3,112$; $p=0,078$).

Vrednosti serumskog VEGF – a su takodje podeljene po kvantilima (“četvrtinama”) vrednosti. Pacijenti sa vrednostima VEGF u okviru tri niža kvantila ($VEGF_{0-75\%}$) imali su statistički značajno duže preživljavanje u odnosu na pacijente za najviši kvantil vrednosti ($VEGF_{75-100\%}$) (Log Rank test; $\chi^2_1=4,043$; $p=0,044$), čime je pokazano da interval kvantila 75 – 100% predstavlja interval u kojem je preživljavanje pacijenata značajno kraće u odnosu na ostatak uzorka.

Tumorski volumen bolesti (“tumor burden”) je bio definisan po kriterijumima Jagannath i saradnika iz 1986.g. tako da su pacijenti svrstavani u dve kategorije sa malim (L) i velikim (H) tumorskim volumenom bolesti.

Mali tumorski volumen (L) je svrstao 10/50 a veliki (H) 19/50 pacijenata sa uznapredovalim kliničkim stadijumima bolesti (Ann Arbor CS III I IV), sa korespondirajućim medijanama vrednosti serumskog VEGF – a 134,4 i 241,5 pg/ml.

Nije ustanovljena statistički značajna razlika u vrednostima serumskog VEGF – a između grupa pacijenata sa malim (L) i velikim (H) tumorskim volumenom (Mann – Whitney Exact Test: $W = 56$; $p = 0,077$), što znači da i pored registrovanog trenda ka statističkoj značajnosti ($p = 0,077$) nije dokazana povezanost tumorskog volumena i nivoa serumskog VEGF – a.

Nema statistički značajne razlike među grupama malog (L) i velikog (H) tumorskog volumena bolesti po broju kompletnih remisija bolesti (CR) (Fisher Exact Test: $p = 0,245$), tako da nije dokazan uticaj tumorskog volumena bolesti na broj kompletnih kliničkih odgovora bolesti.

Nije dokazana statistički značajna razlika u dužini preživljavanja između grupa pacijenata L i H (Log Rank test; $\chi^2_1=1,628$; $p=0,202$), tako da generalno nije dokazana povezanost tumorskog volumena bolesti sa dužinom preživljavanja pacijenata.

Nema statistički značajnih razlika po vrednostima hemoglobina, hematokrita, leukocita, granulocita i limfocita između kategorija $VEGF_1$ i $VEGF_2$.

S druge strane pokazano je da pacijenti $VEGF_1$ grupe imaju statistički značajno veći broj normalnih vrednosti monocita (20/25 tj. 80%) u odnosu na pacijente grupe $VEGF_2$ (11/25 tj. 44%) (Fisher Exact Test: $p = 0,01$), takodje i pacijenti grupe $VEGF_1$ imaju statistički značajno veći broj normalnih vrednosti trombocita (21/25 tj. 84%) u odnosu na pacijente grupe $VEGF_2$ (14/25 tj. 56%) (Fisher Exact Test: $p = 0,035$).

Posmatran je odnos broja trombocita ispod i iznad normale ($450 \times 10^{-9}/l$) i vrednosti serumskog VEGF – a ispod i iznad vrednosti medijane (111,68 pg/ml)

U grupi od 18 pacijenata sa trombocitima $< 450 \times 10^{-9}/l$ i vrednostima s – VEGF ispod 111,68 medijana preživljavanja nije dostignuta sa 95%CI (inf – inf), dok je u drugoj grupi od 7 pacijenata sa trombocitima $> 450 \times 10^{-9}/l$ i vrednostima s – VEGF – a iznad 111,68 medijana preživljavanja je iznosila 13 meseci sa 95CI (8 – inf). Pacijenti prve grupe imaju statistički značajno duže ukupno preživljavanje u odnosu na pacijente druge grupe (Log Rank test; $\chi^2_1=4,7$; $p=0,031$).

U grupi od 18 pacijenata sa trombocitima $< 450 \times 10^{-9}/l$ i vrednostima s – VEGF ispod 111,68 medijana trajanja terapijskog odgovora nije dostignuta sa 95%CI (24 – inf), dok je u drugoj grupi od 7 pacijenata sa trombocitima trombociti $> 450 \times 10^{-9}/l$ i vrednostima s – VEGF iznad 111,68 medijana trajanja terapijskog odgovora je iznosila 15 meseci sa 95CI (8 – inf). Ova razlika je bila statistički značajna (Log Rank test; $\chi^2_1=6,3$; $p=0,011$), i pokazala je značajno duž trajanje terapijskog odgovora pacijenata prve grupe.

U grupi od 18 pacijenata sa trombocitima $< 450 \times 10^{-9}/l$ i vrednostima s – VEGF ispod 111,68 medijana vremena do progresije nije dostignuta sa 95%CI (24 – inf), dok je u drugoj grupi od 7 pacijenata sa trombocitima trombociti $> 450 \times 10^{-9}/l$ i vrednostima s – VEGF iznad 111,68 medijana vremena do progresije je iznosila 15 meseci sa 95CI (8 – inf). Ova razlika je bila statistički značajna (Log Rank test; $\chi^2_1=6,3$; $p=0,011$), i pokazala je značajno duže vreme do progresije pacijenata prve grupe.

Postoji značajna razlika u ukupnom preživljavanju (OS), dužini trajanja terapijskog odgovora (RD) i vremenu do progresije (PFS) u grupi pacijenata sa normalnim brojem trombocita i vrednostima serumskog VEGF ispod medijane.

Posmatran je odnos broja monocita ispod i iznad normale ($0,8 \times 10^{-9}/l$) i vrednosti serumskog VEGF – a ispod i iznad vrednosti medijane (111,68 pg/ml)

U grupi od 20 pacijenata sa monocita $< 0,8 \times 10^{-9}/l$ i vrednostima s – VEGF ispod 111,68 medijana preživljavanja nije dostignuta sa 95%CI (inf – inf), dok je u drugoj grupi od 12 pacijenata sa vrednostima monocita $> 0,8 \times 10^{-9}/l$ i vrednostima s – VEGF iznad 111,68 medijana preživljavanja je iznosila 8 meseci sa 95CI (5 – inf). Ova razlika je bila statistički značajna (Log Rank test; $\chi^2_1=8,6$; $p=0,003$), i pokazala je značajno duže preživljavanje pacijenata prve grupe.

U grupi od 17 pacijenata sa monocita $< 0,8 \times 10^{-9}/l$ i vrednostima s – VEGF – a ispod 111,68 medijana trajanja terapijskog odgovora nije dostignuta sa 95%CI (24 – inf), dok je u drugoj grupi sa 7 pacijenata sa vrednostima monocita $> 0,8 \times 10^{-9}/l$ i vrednostima s – VEGF – a iznad 111,68 medijana trajanja terapijskog odgovora je iznosila 18 meseci sa 95CI (8 – inf). Ova razlika je bila statistički značajna (Log Rank test; $\chi^2_1=4,6$; $p=0,032$), i pokazala je značajno duže trajanje terapijskog odgovora pacijenata prve grupe.

U grupi od 17 pacijenata sa monocita $< 0,8 \times 10^{-9}/l$ i vrednostima s – VEGF ispod 111,68 medijana vremena do progresije nije dostignuta sa 95%CI (24 – inf), dok je u drugoj grupi od 8 pacijenata sa vrednostima monocita $> 0,8 \times 10^{-9}/l$ i vrednostima s – VEGF iznad 111,68 medijana vremena do progresije je iznosila 8 meseci sa 95CI (5 – inf). Ova razlika je bila statistički značajna (Log Rank test; $\chi^2_1=6,6$; $p=0,01$), i pokazala je značajno duže trajanje terapijskog odgovora pacijenata prve grupe.

Postoji značajna razlika u ukupnom preživljavanju (OS), trajanju terapijskog odgovora (RD), dužini trajanja terapijskog odgovora (RD) i vremenu do progresije (PFS), sa značajno dužim preživljavanjem u grupi pacijenata sa normalnim brojem monocita i vrednostima serumskog VEGF ispod medijane.

Takodje je bio interesantan odnos srednjeg trombocitog volumena (MPV) i vrednosti serumskog VEGF – a ispod ($VEGF_1$) i iznad ($VEGF_2$) medijane vrednosti (111, 68 pg/ml).

Unutar cele grupe nije bilo trombocita sa većim vrednostima MPV od gornje granice normalne vrednosti (10,4 fl).

Srednja vrednost MPV u celoj grupi pacijenata je bila 7,67 fl, dok je medijana ustanovljena na vrednosti 7,5 fl sa rasponom vrednosti od 6 do 10,3 fl.

Unutar registrovanog raspona vrednosti MPV (6 – 10,3 fl) raspodela je sagledana u odnosu na meru centralne tendencije – srednju vrednost (7,67 fl).

Učestalost MPV $< 7,67(fl)$ je bila statistički značajno veća u $VEGF_2$ grupi sa vrednostima VEGF – a iznad medijane (16/25 tj. 56%), nego u $VEGF_1$ grupi sa vrednostima ispod medijane (10/25 tj. 35.6%) (Person χ^2 -Test: $\chi^2_1= 3,943$, $p=0,047$), prikazujući odsustvo pozitivne povezanosti volumena trombocita i koncentracije serumskog VEGF – a u posmatranoj grupi pacijenata.

Razmatranjem uticaja eliminacije serumskog VEGF – a iz cirkulacije, nije ustanovljena statistički značajna razlika između ekskretorne funkcije bubrega i kategorija serumskog VEGF – a.

Medijana klirensa kreatinina (CCr) u grupi pacijenata $VEGF_1$ je bila 70,9 ml/min, dok je medijana klirensa kreatinina (CCr) u grupi pacijenata $VEGF_2$ bila 60,72 ml/min, (Mann-Whitney Test: $W=292$; $p = 0,744$).

U daljem razmatranju posmatran je odnos serumske koncentracije VEGF – a i serumskih koncentracija laktičke dehidrogenaze (LDH) i beta 2 mikroglobulina (B2M) koji sačinjavaju tzv. “solubilni sistem stadiranja (SSS)” agresivnih non – Hočkinskih limfoma po kriterijumima Swan i saradnika iz 1989.g..

Formirane su tri SSS kategorije sa pripadajućim medijanama vrednosti serumskog VEGF – a:

L (LDH i B2M $<<$) sa 12/50 (24%) pacijenata i medijanom s – VEGF – a 69 pg/ml,

I (LDH i B2M $<>$ ili $><$) sa 18/50 (36%) pacijenata i medijanom s – VEGF – a 102,7 pg/ml i

H (LDH i B2M $>>$) sa 20/50 (40%) pacijenata i medijanom s – VEGF – a 178,1 pg/ml.

Po dve kategorije su međusobno komparirane u odnosu na vrednosti medijana s – VEGF: L vs. H (Fisher Exact Test: $p = 0,049$), L vs. I (Fisher Exact Test: $p = 0,362$), I vs. H (Fisher Exact Test: $p = 0,346$).

Prikazana je statistički značajna razlika po vrednostima medijana s – VEGF između kategorija L i H ($p = 0,049$).

Utvrđena je statistički značajna razlika po odgovoru na terapiju između kategorija L i H, odnosno, odgovor na terapiju je bio značajno bolji u kategoriji pacijenata sa ispodgraničnim vrednostima LDH i B2M i nižom vrednošću medijane s – VEGF .

L vs. H (Fisher Exact Test: $p = 0,046$),

Postoji takodje statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju (OS) između kategorija L i H, tačnije ukupno preživljavanje je bilo značajno duže u kategoriji pacijenata sa ispodgraničnim vrednostima LDH i B2M i nižom vrednošću medijane s – VEGF –a, L vs. H (Log Rank test; $\chi^2_1=4,9$; $p = 0,026$).

Razmatran je takodje odnos serumskih nivoa VEGF – a I klasičnih prognostičkih sistema agresivnih non Hočkinskih limfoma kao što je IPI prognostički indeks.

Ustanovljena je statistički značajna povezanost nivoa serumskog VEGF ispod vrednosti medijane (kategorija VEGF₁) i kategorija po IPI klasifikaciji 0,1 i 2, koje pripadaju niskom, nisko / umerenom i umerenom riziku bolesti (Person χ^2 -Test: $\chi^2_1= 4,394$; $p=0,036$).

Prikazana je značajno bolji odgovor na terapiju (RR) u grupi pacijenata sa povoljnim IPI skorom 0,1 i 2 i vrednostima s – VEGF ispod medijane 111,68 pg/ml (Fisher Exact Test: $p = 0,045$).

Značajno je duža medijana ukupnog preživljavanja (OS) u kategoriji pacijenata sa povoljnim IPI skorom (0,1,2) i vrednostima s – VEGF ispod medijane ($< 111,68$ pg/ml).

U ovoj kategoriji (17 pacijenata) medijana nije dostignuta (inf, 95%CI inf-inf), dok u drugoj kategoriji (13 pacijenata) sa nepovoljnim IPI skorom (3,4,5) i sa vrednostima s – VEGF iznad medijane ($> 111,68$ pg/ml), medijana preživljavanja je iznosila 13 meseci (95%CI 5 – inf).

Ova razlika je bila statistički značajna (Log Rank test; $\chi^2_1=4,1$; $p = 0,043$).

Registruje se značajno duže trajanje terapijskog odgovora (RD) u grupi pacijenata sa povoljnim IPI skorom(0,1,2) i vrednostima s – VEGF ispod medijane ($< 111,68$ pg/ml).

U ovoj kategoriji od 14 pacijenata medijana je bila 26 meseci (95%CI 24 - inf), dok u drugoj kategoriji od 6 pacijenata sa nepovoljnim IPI skorom (3,4,5) i sa vrednostima s – VEGF iznad medijane ($> 111,68$ pg/ml) medijana je iznosila 18 meseci (95%CI 8 – inf).

Ova razlika je bila statistički značajna (Log Rank test; $\chi^2_1=9,8$; $p = 0,001$).

Registruje se značajno duže vreme do progresije (TTP) u grupi pacijenata sa povoljnim IPI skorom(0,1,2) i vrednostima s – VEGF ispod medijane ($< 111,68$ pg/ml).

U ovoj kategoriji od 14 pacijenata medijana je bila 26 meseci (95%CI 24 - inf), dok u drugoj kategoriji od 9 pacijenata sa nepovoljnim IPI skorom (3,4,5) i sa vrednostima s – VEGF iznad medijane ($> 111,68$ pg/ml) medijana je iznosila 18 meseci (95%CI 8 – inf).

Ova razlika je bila statistički značajna (Log Rank test; $\chi^2_1=15$; $p = 0,0001$).

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Prikazani rezultati snažno afirmišu stav koji je ranije naveden u literaturi da niski pretretmanski nivoi serumskog VEGF - a kao i nivoi VEGF - a koji ne pripadaju najvišem kvartilu vrednosti predstavljaju pozitivne prognostičke parametre u smislu značajno boljeg odgovora na terapiju i kao i značajno produženog preživljavanja. Ovim

se potvrđuje da je najviši kvartil vrednosti VEGF - a prognostički lošiji u odnosu na preživljavanja pacijenata.

Novi podatak je da ovaj parametar značajno utiče i na produženje vremena do progresije pacijenata sa uznapredovalim difuznim krupnoćelijskim B limfomima iz naše studije.

Iako nije dokazana statistička značajnost ($p = 0,077$), dobijeni trend ka statističkoj značajnosti ukazuje da ipak postoji mogućnost povezanosti tumorskog volumena bolesti sa povišenim serumskim nivoom VEGF - a što bi bilo u skladu sa rezultatima drugih studija koji se odnose na povezanost progresivnih solidnih tumora i povišenih serumskih nivoa VEGF - a .

Potvrđena je ranija pretpostavka da ekskretorna funkcija bubrega ne utiče na serumski nivo VEGF – a kod agresivnih non Hoćkinskih limfoma..

U smislu povezanosti vrednosti serumskog VEGF – a i vrednosti pojedinih ćelijskih elemenata periferne krvi sintetišući brojne predhodne literaturne podatke treba istaći da u različitim tipovima malignih tumora:

broj trombocita i leukocita je u pozitivnoj povezanosti sa koncentracijom VEGF u cirkulaciji,

pored broja trombocita postoji i pozitivna povezanost zapremine trombocita i koncentracije VEGF u cirkulaciji,

hipoksija deluje kao faktor oslobađanja VEGF iz tumorskog odeljka, i niska koncentracija hemoglobina je u obrnutoj povezanosti sa koncentracijom VEGF u cirkulaciji,

hipoksija takođe može biti faktor oslobađanja VEGF iz monocita periferne krvi.

U našoj studiji na homogenom uzorku pacijenata sa dijagnozom non Hoćkinskog limfoma difuznog krupnoćelijskog tipa u uznapredovalim kliničkim stadijumima, utvrđene su statistički značajna povezanost nivoa VEGF i pojedinih ćelijskih elemenata periferne krvi:

serumskog nivoa VEGF iznad medijane i trombocitoze ($p = 0,035$),

serumskog nivoa VEGF iznad medijane i monocitoze ($p = 0,01$),

pacijenti sa normalnim brojem trombocita i monocita su imali duže ukupno preživljavanje (OS), trajanje terapijskog odgovora (RD) i vreme do progresije (RD),

serumskog nivoa VEGF ispod medijane i vrednosti srednjeg trombocitnog volumena (MPV) iznad srednje vrednosti ($p = 0,047$), sugerišući odsustvo pozitivne povezanosti volumena trombocita i koncentracije s – VEGF .

Nisu nađene statistički značajne povezanosti:

serumskog nivoa VEGF iznad medijane i ispodgraničnih nivoa hemoglobina ($p = 0,234$) i hematokrita ($p = 0,551$) i

serumskog nivoa VEGF iznad medijane i granulocitoze ($p = 0,199$) i leukocitoze ($p = 0,165$).

1989.g. definisan je tzv. Serološki Sistem Stadiranja („Serologic Staging System“ – SSS) za grupu krupnoćelijskih limfoma baziran na inicijalnim serumskim nivoima laktičke dehidrogenaze (LDH) i beta 2 mikroglobulina (B2M).

Swan i saradnici su u pomenutoj studiji ustanovili da zavisno od međusobnih odnosa serumskih vrednosti LDH i B2M (vrednosti oba faktora iznad nivoa graničnih vrednosti, vrednosti jednog faktora ispod a drugog iznad nivoa graničnih vrednosti i vrednosti oba faktora ispod nivoa graničnih vrednosti), se mogu formirati tri prognostičke grupe

pacijenata sa krupnoćelijskim limfomima označene kao: H („high“), I („intermediate“) i L („low“).

U daljem razmatranju ustanovljena je razlika u stopama kompletnih remisija nakon lečenja hemioterapijom među grupama H, I i L (44%, 69% i 93%), kao i značajna razlika u verovatnoćama nastanka relapsa nakon 24 meseca praćenja (u H grupi 73%, u I grupi 39%, u L grupi 0%), sa visokim nivoima statističke značajnosti komparacijom među grupama (H vs. I, $p = 0,002$ i I vs. L, $p = 0,018$), takođe i sa visokim nivoom razlika u verovatnoći dvogodišnjeg preživljavanja (u H grupi 19%, u I grupi 54% i u L grupi 100%) (H vs. I, $p = 0,002$ i I vs. L, $p = 0,006$). (34)

U našoj studiji je razrađena ideja da se elementi Serološkog Sistema Stadiranja (SSS) i serumski nivo VEGF razmatraju komparativno.

Pokazano da serumski VEGF kao komparativni parametar LDH i B2M značajno afirmiše prognostički značaj Serološkog Sistema Stadiranja (SSS) tako da pripadnost grupi L sa normalnim vrednostima LDH i B2M i istovremena pripadnost najnižim vrednostima s – VEGF ispod vrednosti grupne medijane, ima pozitivan prognostički značaj za postizanje kompletnog terapijskog odgovora (CRR) i ukupno preživljavanje (OS).

Razmatranjem odnosa nivoa serumskog VEGF – a i kategorija IPI prognostičkog indeksa, sumarno se može konstatovati da serumski nivo VEGF značajno afirmiše prognostički značaj IPI indeksa kao komparativni parametar u odnosu na ukupno preživljavanje, odgovor na terapiju, trajanje terapijskog odgovora i vreme do progresije .

U studiji Pedersena i saradnika iz 2005.g. na homogenoj grupi od 76 pacijenata sa difuznim krupnoćelijskim B limfomima utvrđena je razlika povoljnog IPI skora (0 – 2) i nepovoljnog IPI skora (3 – 5) po medijanama serumskog VEGF (125 pg/ml vs. 246 pg/ml, $p < 0,001$). U multivarijantnoj statističkoj analizi utvrđeno je da kombinacija serumskih vrednosti VEGF i nivo ekspresije bcl – 2 onkogeni ima nezavisan uticaj na preživljavanje pacijenata zajedno sa IPI skorom. U zaključku studije navodi se značajan doprinos koncentracije biomarkera (između ostalih i VEGF - a) prognostičkoj informaciji IPI skora.

U našoj studiji su definisane grupe pacijenata koje pokazuju značajne razlike u odnosu na nivo kompletnih remisija (CRR): 82,35% vs. 38,46% ($p = 0,045$), kao i u odnosu na medijane trajanja terapijskog odgovora (RD) ($p = 0,001$) i medijane vremena do progresije (TTP) ($p = 0,0001$). Takođe je registrovana razlika u trajanju prosečnog dvogodišnjeg preživljavanja na nivou $p = 0,043$.

Podaci iz naše studije potvrđuju značajnu razliku između povoljnog i nepovoljnog IPI skora (0 – 2 vs. 3 – 5) i odgovarajućih vrednosti serumskog VEGF za svaku grupu.

Objavljeni rezultati koji čine deo teze

1. Jelić S, Jovanović V, Kovčin V, Babović N, Milanović N. Detekcija histoloških tipova non-Hodgkin-skih limfoma osetljivih na T-CAM hemioterapijsku kombinaciju. Bilten za hematologiju i transfuziologiju. Vol.14(1), 78, 1986
2. Milanović N, Jelić S, Kovčin V, Babović N, Marinković M: Non-IPSID limfomi digestivnog trakta i kliničke i imunoheмиjske karakteristike. Knjiga sažetaka VII Kongres kancerologa Jugoslavije,121, 1987
3. Milanović N, Jelić S, Jovanović V, Babović N, Kovčin V: Imunoblastična transformacija hronične limfocitne leukemije. Zbornik sažetaka XXIV Kancerološka nedelja i XXI Republičko savetovanje zdravstvene zaštite od malignih oboljenja (3-4 decembar, 1987)
4. Jelić S, Jovanović, Kovčin V, Babović N, Milanović N.: Detection of non-Hodgkin (NH) lymphoma histological types responsive to T-CAM combination chemotherapy. Abs.3th. Inter.Conf.Mal.Lymphoma, Lugano, T-114,1987
5. Babović N, Milanović N, Vasović S, Kovčin V, Jelić S: Povišene transaminaze u bolesnika pod agresivnom hemioterapijom; hepatotoksičnost hemioterapije ili udruženost sa Hbs antigenom. Zbornik radova XXIX Naučni sastanak mikrobiologa, epidemiologa i infektologa Jugoslavije, 17, 1988
6. Jelić S, Babović N, Kovčin V, Vasović S, Milanović N, Tomašević Z, Vuletić L: Rezultati lečenja adultne limfoblastne bolesti ("limfomska" i "leukemijska" faza) modifikovanim LAL 16/18 programom. Bilten za hematologiju i transfuziologiju, Vol. 16(1), 9.11, 1988
7. Jelić S, Milanović N, Tomašević Z, Babović N, Kovčin V, Vuletić L: Adriablastine-Teniposide-Cyclophosphamide (T-CAM) versus Epirubicine-Teniposide-Cyclophosphamide (T-CEM) for intermediate grade non-Hodgkin lymphoma. Abs.4th. Inter.Conf.Mal.Lymphoma, Lugano, Abs.No. T-75, 1990
8. Milanović N, Jelić S, Kovčin V, Babović, Marinković M: Non-IPSID enteromesenterial lymphoma in Serbia, clinical and immunochemical features in 20 patients. Abs.4th. Inter.Conf.Mal.Lymphoma. Lugano, Abs. No. P-27, 1990
9. Filipović-Lješćković I, Jelić S, Nikolić Lj, Milanović N, Tomašević Z, Vasović S, Vuletić L: Frequency of positive findings for antibodies against 3 lymphotropic retroviruses in patients of the Institute of Oncology and Radiology in Belgrade. Bilten za hematologiju i transfuziju Vol. 17(1), 259, 1990
10. Tomašević Z, Milanović N, Juranić Z, Opić M, Jelić S, Vuletić L: Limfom gama lanaca; prikaz slučaja. Bilten za hematologiju i transfuziju. Vol. 17(1), 236, 1990
11. Milanović N, Jelić S, Jovanović V, Veža Z, Babović N, Kovčin V, Matijašević M: Imunoblastička transformacija hronične limfocitne leukemije i low/intermediate grade non-Hodgkin limfoma. Bilten za hematologiju i transfuziologiju Vol. 17(1), 177, 1990

12. Kovčin V, Jelić S, Milanović N, Tomašević Z: Ofloxacin u lečenju lokalizovanih infekcija u bolesnika predviđenih za agresivnu hemioterapiju. Zbornik sažetaka XXVIII Kancerološka nedelja i XXV Republičko savetovanje zdravstvene zaštite od malignih oboljenja (novembar, 1991)
13. Jelić S, Babović N, Kreačić M, Kovčin V, Milanović N, Tomašević Z: Iskustva sa primenom Pefloxacina u febrilnim neutropenijama. Zbornik sažetaka XXVIII Kancerološka nedelja i XXV Republičko savetovanje zdravstvene zaštite od malignih oboljenja (novembar, 1991)
14. Milanović N, Jelić S, Kovčin V, Babović N, Marinković M: Non-ipsid endomezenterijalni limfomi; kliničke i imunohemijske karakteristike u 20 bolesnika. Zbornik sažetaka XXIX Kancerološka nedelja i XXVI Republičko savetovanje zdravstvene zaštite od malignih oboljenja (5-6 novembar, 1992)
15. Jelić S, Filipović I, Milanović N, Kovčin V: Limfomi u HIV-1+ intravenskih narkomana na materijalu Instituta za onkologiju i radiologiju u Beogradu. Zbornik sažetaka XXIX Kancerološka nedelja i XXVI Republičko savetovanje zdravstvene zaštite od malignih oboljenja (5-6 novembar, 1992)
16. Ristović Z, Ribarić B, Šestarić M, Jelić S, Kovčin V, Milanović N, Radosavljević D, Milićević N, Popov I: "HEM" programski paket za automatsko praćenje i obradu podataka pacijenata uključenih u hemioterapijske kliničke studije. Zbornik sažetaka XXIX Kancerološka nedelja i XXVI Republičko savetovanje zdravstvene zaštite od malignih oboljenja (5-6 novembar, 1992)
17. Jelić S, Milanović N, Jovanović V, Oprić M: Primary gastric lymphomas - no adjuvant treatment following radical surgery. Abs. Fifth International Conference on Malignant lymphoma. Abs. No. T126, P-142, Lugano, 1993.
18. Kovčin V, Jelić S, Oprić M, Milanović N: Pet slučajeva non-Hodgkin limfoma facijalnog masiva. Zbornik sažetaka XXX Kancerološka nedelja i XXVII Republičko savetovanje zdravstvene zaštite od malignih oboljenja (4-5 novembar, 1993)
19. Jelić S, Kovčin V, Jovanović, Oprić M, Milanović N: Primary gastric non-Hodgkin's lymphoma localized to the gastric wall: No adjuvant treatment following radical surgery. Oncology 51: 270-272, 1994.
20. Milanović N, Jelić S, Jovanović V, Kovčin V, Oprić M, Marinković M: Non-IPSID small intestinal lymphoma: Evidence for disseminated disease at presentation. Neoplasma 41, (6), 359 -362, 1994.
21. Matković S, Milanović N, Jelić S, Kovčin V, Janković G. Non Hodgkin's lymphoma of large bowel-case report. Archive of oncology (Suppl. 1) 3; A20, 12, 1995.
22. Kovčin V., Jelić S., Radulović S., Milanović N., Jovanović V., Oprić M. Modified ProMaCE regimen in the treatment of patients with centroblastic lymphoma. Annals of Oncology, Vol. 7, Suppl. 3, Abs. 502, 1996
23. S. Jelić, V. Jovanović, N. Milanović, M. Marinković, V. Kovčin, D. Milošević, M. Vlajić. Richter syndrome with emphasis on large-cell non-Hodgkin lymphoma in

previously unrecognized subclinical chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma*, 44 (1), 63-68, 1997

24. S. Jelić, S. Bošnjak, Z. Ristović-Bizetić, S. Radulović, N. Milanović, L. Mitrović: Effect of prophylactic G-CSF administration on peripheral blood granulocyte count and resulting clinical benefits during treatment of intermediate and high grade non-Hodgkin's lymphoma with intensive chemotherapy. *Journal of BUON*; 3: 227-234, 1997
25. Tomašević Z., Jelić S., Nikolić-Tomašević Z., Milanović N., Matković S. Prognostic significance and qualitative analysis of circulating immune complexes in Hodgkin's disease. *Annals of Oncology*. 9 (Suppl.4), 114 A548, 1998
26. Filipović-Lješković I., Jelić S., Tomašević Z., Milanović N. Initial levels of the plasma beta2 microglobulin in patients with different histological types of non-Hodgkin lymphoma. *Journal of BUON*. 3(SupplA)32, O88, 1998
27. Milanović N., Jelić S., Babović N., Tomašević Z. Liposarcomas prognostic factors influencing survival in disseminated disease. *Journal of BUON*. 3(Suppl.A)44, P30, 1998
28. Jelić S, Milanović N, Tomašević Z, Matković S, Gavrilović D. Comparison of two non-antracycline – containing regimens for elderly patients with diffuse large-cell non hodgkin's lymphoma; possible pitfalls in results reporting and interpretation. *Neoplasma*. 6, in press, , 1999
29. Jelić S, Bošnjak S, Milanović N, Tomašević Z, Jovanović V. Aggressive chemotherapy with G-CSF support for the so-called "Malignant Histocytosis". *Journal of BUON*. 4, 269-273, 1999
30. Matković S, Jelić S, Jovanović D., Manojlović N, Milanović N. Non-hodgkin's lymphomas with primary localization in large bowel and rectum. *Medical Sci. Monitor*. 2000 in press, , 2000
31. Tomašević Z, Jelić S, Nikolić-Tomašević Z, Milanović N, Matković S. Prognostic significance and qualitative analysis of circulating immune complexes in Hodgkin's disease. *Annals of Oncology*, 9 (Suppl. 4), 114, Abs. 548, 1998
32. Milanović N, Jelić S, Tomašević Z, Matković S, Poleksić Lj. Imaging algorithm for primary bone lymphomas (PBL) and review of eleven cases. *Annals of Oncology*, 10 (Suppl. 3), 135, Abs. 489, 1999
33. Tomašević Z, Jelić S, Matković S, Milanović N: Mycosis fungoides/Sezary syndrome: therapy and dilemmas. *Annals of Oncology*, 10 (Suppl. 3), 135, Abs. 490, 1999
34. Filipović-Lješković I, Jelić S, Tomašević Z, Milanović N. Initial levels of the plasma beta2 microglobulin in patients with different histological types of non-Hodgkin lymphoma. *Eur. J. Cancer*. 35 (Suppl. 4): S117, Abs. 421, 1999
35. Tomašević Z., Jelić S., Matković S., Milanović N. Cutaneous T-cell lymphomas-mycosis fungoides and sezary syndrome: therapy and dilemmas. *Zdravstvena zaštita*. 27 (Suppl.), 91, O50, 1998
36. Filipović-Lješković I., Jelić S., Tomašević Z., Milanović N. Inicijalne vrednosti serumskog beta-2 mikroglobulina u bolesnika sa različitim histološkim tipovima non-Hodgkin limfoma. *Bulletin of Hematology*. 58 (2/3), 81, PP77, 1998
37. Babović N., Jelić S., Milanović N., Tomašević Z. Primary lymphomas of the breast - a review of 10 cases. *Zdravstvena zaštita*. 27 (Suppl.), 93, O52, 1998

38. Milanović N., Jelić S., Tomašević Z., Matković S., Poleksić Lj., Jovanović V. Non-Hodgkin limfomi sa inicijalnom prezentacijom na skeletu. Bulletin of Hematology. 58 (2/3), 80, PP73, 1998
39. Jelić S., Filipović-Lješковиć I., Milanović N., Tomašević Z. Primary cutaneous b-cell non hodgkin's lymphoma; clinical characteristics, natural history and treatment options. Zdravstvena zaštita. 27 (Suppl.), 92, O51, 1998
40. Jelić S., Milanović N., Tomašević Z., Matković S. Kombinovana hemioterapija bez antraciklina u starih ljudi sa krupnoćelijskim non-Hodgkin limfomima: moguće omaške u prikazu i interpretaciji rezultata. Bulletin of Hematology. 26 (2/3), 49, US43, 1998
41. Matković S., Jelić S., Manojlović Nebojša, Milanović N. Non Hodgkin lymphoma with primary localization within colon and rectum. Zdravstvena zaštita. 27 (Suppl.), 94, O54, 1998
42. Matković S., Jelić S., Manojlović Nebojša, Milanović N. Non-Hodgkin limfomi sa primarnom lokalizacijom na kolonu i rektumu. Bulletin of Hematology. 58 (2/3), 59, US81, 1998
43. Milanović N., Jelić S., Tomašević Z., Matković S., Poleksić Lj., Jovanović V. Non-Hodgkin lymphomas with primary skeletal presentation. Zdravstvena zaštita. 27 (Suppl.), 95, O57, 1998
44. Milanović N., Tomašević Z., Jelić S. Etoposide and dose dense scheduling of alfa 2 A interferon in treatment of resistant cutaneous T / cell lymphoma (CTCL) stage I B - II B. Hematologica. The Hematology Journal 89 (suppl. 5), 709, 240, 2004.
45. Milanovic N., Matkovic S., Ristic D., Jelic S. Corrlation of tumor burden, serum VEGF, LDH and beta 2 microglobulin levels in patients with advanced stages of diffuse large B cell lymphoma (DLCL B). Annals of Oncology 19 (suppl. 8), 765, 238, 2008.

E. Zaključak

Doktorska disertacija dr. Nenada Milanovića pod nazivom “Prognostički značaj određivanja serumskog vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (s – VEGF) u pacijenata sa difuznim krupnoćelijskim B non – Hočkinskim limfomom”, ispunjava kriterijume neophodne za odbranu rada.

Rad predstavlja doprinos u izučavanju neoangiogeneze kao i prognoze i ishoda ove bolesti. Nadjena je povezanost sa statističkom značajnošću serumskog vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (s – VEGF) i serumskih nivoa laktičke dehidrogenaze (LDH) i beta 2 mikroglobulina (B2M), nivoa broja trombocita i monocita u cirkulaciji i prognostički povoljnih IPI kategorija, uz graničnu statističku značajnost povezanosti sa tumorskom volumenu bolesti.

Rad je aktuelan, sistematično izveden, ciljevi rada su jasno izneti i ostvareni. Rezultati su koncizno izneti i statistički jasno obradjeni, dok je diskusija kao i zaključci rada su dobro koncipirani. Takođe je proučena i citirana relativno obimna literature.

Na osnovu kompletnog uvida u izveštaj komisija daje jednoglasno mišljenje da priložena doktorska disertacija predstavlja značajan naučni i stručni doprinos u oblasti malignih limfoma i neoangiogeneze.

U Beogradu, maj 2009.g.

Mentor

Prof. dr. sci. med. Milan Petrović.

Članovi komisije

Prof. dr. sci. med. Biljana Mihaljević,

Prof. dr. sci. med. Svetislav Tatić,

Prof. dr. sci. med. Svetislav Jelić