

NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 03.04.2024. godine, broj 19/XXIII-4/3-MM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Ispitivanje prognostičkih i prediktivnih kliničkih i molekularnih markera u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma neoadjuvantnom radiohemioterapijom primenom volumnog rotacionog planiranja zračne terapije i simultanog integrisanog *boost-a*“

kandidata dr Mladena Marinkovića, specijaliste radijacione onkologije, zaposlenog na Klinici za radijacionu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. Mentor 1 ove teze je Doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, mentor 2 N. Sav. dr sc. Milena Čavić, a komentor Prof. dr Nataša Maksimović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. **Prof. dr Velimir Marković**, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr Aleksandra Đurić Stefanović**, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. **N. Sav. dr sc. Radmila Janković**, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije
4. **Prof. dr Vesna Plešinac Karapandžić**, profesor u penziji Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
5. **Prof. dr Nebojša Manojlović**, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta odbrane u Beogradu, Vojnomedicinska akademija

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija kliničkog asistenta dr Mladena Marinkovića, specijaliste radijacione onkologije, napisana je na ukupno 117 stranica i sadržaj je izložen kroz sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 81 tabela, 25 ilustracija i 206 literaturnih navoda. Pored navedenog, ova doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o objavljenim radovima koji su proistekli iz istraživanja realizovanih u okviru doktorske disertacije, spisak skraćenica korišćenih u tekstu i informacije o komisiji i mentorima.

Prvo poglavlje, **uvod**, podeljeno je na više logičnih tematskih celina. U početnom delu je dat pregled epidemiologije, etiologije, anatomije, kliničke slike i dijagnostičke obrade karcinoma rektuma, sa definisanjem lokalno uznapredovalog stadijuma bolesti, uz prikladne ilustracije. U kontekstu terapije, **uvod** prikazuje različite modalitete neoadjuvantnog lečenja karcinoma rektuma. Poseban osvrt je na modifikacijama neoadjuvantnog radiohemioterapijskog lečenja, uz naglasak na kliničku primenu produženja perioda između završenog neoadjuvantnog lečenja i

hirurgije, kao i intenziviranje neoadjuvantne radioterapije i hemioterapije. U okviru **uvoda** analizirana je primena modernih radioterapijskih tehnika u eskalaciji radioterapijske doze u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma (LUKR) sa ciljem poboljšanja lokalnog odgovora i, posredno, krajnjih rezultata lečenja. Dalje su prikazani prediktivni i prognostički parametri, uključujući ulogu dijagnostike, patohistoloških i laboratorijskih parametara, kao i molekularnih markera u predikciji odgovora na terapiju, uz relevantne studije i primere. U okviru sledeće celine **uvoda** objašnjena je uloga *in silico* metode u selekciji gena za predikciju odgovora karcinoma rektuma na neoadjuvantnu terapiju, uz konkretne primere iz literaturnih podataka. Završni deo **uvoda** se odnosi na prikaz literaturnih podataka sa aspekta značaja individualizovanog pristupa lečenja karcinoma rektuma u odnosu na prognostičke i prediktivne markere.

U skladu sa prethodno iznetim, formulisani su sledeći **ciljevi istraživanja** ove doktorske disertacije: (1) Ispitivanje povezanosti ishoda na sprovedeno lečenje neoadjuvantnom radiohemioterapijom sa karakteristikama pacijenata, oboljenja i lečenja, u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, uz povećanje radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost-a*; (2) Ispitivanje povezanosti ishoda na sprovedeno lečenje neoadjuvantnom radiohemioterapijom sa stepenom ekspresije *in silico* analizom odabranih molekularnih markera, u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, uz povećanje radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost-a*; (3) Ispitivanje razlika u ishodima sprovedenog lečenja neoadjuvantnom radiohemioterapijom između standardnog pristupa lečenju i pristupa sa povećanom dozom zračne terapije; i (4) Ispitivanje razlika u akutnoj toksičnosti između standardnog pristupa lečenju i pristupa sa povećanom dozom zračne terapije.

U poglavlju **materijali i metode** dat je detaljan prikaz metoda primenjenih u istraživanju, saglasno postavljenim ciljevima. Navedeno je da se radi o kohortnoj studiji koja je sprovedena na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije i precizno su prikazani kriterijumi za uključenje i isključenje ispitanika iz studije. U periodu od juna 2020. godine do januara 2022. godine istraživanjem je obuhvaćena kohorta od 75 pacijenata sa LUKR (prospektivna kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije). Svi pacijenti su podvrgnuti neoadjuvantnoj radioterapiji (nCRT) primenom volumetrijski modulisane lučne tehnike zračenja uz simultani integrisani *boost* (VMAT-SIB) do ukupne tumorske doze (TD) od 54 Gy u 25 frakcija, uz konkomitantnu hemioterapiju po 5-fluorouracil-leukovorin protokolu (5-FU-LV). Klinički odgovor na sprovedeno lečenje je procenjivan u osmoj nedelji nakon nCRT pomoću magnetne rezonancije (MR) male karlice i kontrolne rektoskopije. Grupa pacijenata koji su dobro odreagovali na nCRT (engl. *Responders* – R) obuhvatala je pacijente sa kliničkim kompletnim odgovorom (cCR) bez sprovedenog operativnog lečenja, kao i operisane pacijente sa tumorskim regresionim gradusom 1 i 2 (TRG1-2). Grupa koja je slabije odreagovala (engl. *Non-Responders* – NR) definisana je sa TRG3-5. U cilju poređenja rezultata lečenja i toksičnosti pristupa lečenja sa povećanjem radioterapijske doze uz aplikovanje simultanog integrisanog *boost-a* (prospektivna kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije), posmatrana je i kohorta ispitanika lečenih primenom standardne neoadjuvantne radiohemioterapije (retrospektivna kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom). Standardni radioterapijski pristup je podrazumevao planiranje zračne terapije primenom 3D konformalne tehnike zračenja (engl. *Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy* – 3D CRT) sa ukupnom TD 50,4 Gy u 28 frakcija i konkomitantnom HT po 5FU-LV protokolu. Kohortu za poređenje činila su 62 pacijenta koji su lečeni u periodu od 2018. do 2019. godine na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.

In silico metod je primenjen radi identifikovanja najboljih gena kandidata za predikcija odgovora karcinoma rektuma na nCRT, čija ekspresija je naknadno određivana u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije koristeći kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu (engl. *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* – qRT-PCR). Analiza je vršena iz formalinom fiksiranih parafinom ukalupljenih uzoraka karcinoma rektuma (engl. *formaline-fixed paraffin-embedded* – FFPE) uzetih inicijalno pri postavljanju dijagnoze bolesti.

Za istraživanja u okviru ove doktorske disertacije dobijena su odobrenja Etičkog odbora

Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (odluka br. 2211-01), kao i Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (odluka br. 1322/XII-17). Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom i standardima Svetske zdravstvene organizacije za istraživanja koja se sprovode na ljudima. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključenja u studiju.

Rezultati sprovedenih istraživanja su predstavljeni u skladu sa postavljenim ciljevima, na pregledan i sistematičan način uz razumljiv i logično organizovan tekst i prateće tabelarne i grafičke prikaze.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Na kraju disertacije, predstavljeni su **zaključci**, kao sažet prikaz najvažnijih rezultata koji su proistekli iz analize realizovanih istraživanja. Izneti zaključci su naučno i stručno relevantni, direktno povezani sa postavljenim ciljevima i u skladu sa postojećim znanjima.

U poglavlju **literatura** dat je sveobuhvatan i relevantan spisak 206 literaturnih navoda prikladnih temi istraživanja.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu *Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu* („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18) i izveštaja specijalizovanog softvera *iThenticate*, kojim je izvršena elektronska provera obima i sadržine podudaranja teksta doktorske disertacije „Ispitivanje prognostičkih i prediktivnih kliničkih i molekularnih markera u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma neoadjuvantnom radiohemioterapijom primenom volumnog rotacionog planiranja zračne terapije i simultanog integrisanog *boost-a*“ autora dr Mladena Marinkovića sa drugim tekstovima dostupnim za poređenje, konstatovano je da indeks podudarnosti iznosi 10%. Analiza izveštaja zasnovana na relevantnim kriterijumima, uključujući količinu podudaranja, ali i smisao, značaj i povezanost delova teksta kod kojih je ono utvrđeno, ukazuje da je navedeni stepen podudarnosti posledica standardnih formulacija, fraza i stručne terminologije, bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, kao i prethodno objavljenih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njegove disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika.

Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije.

C) Kratak opis postignutih rezultata

U kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, uz povećanje radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost-a*, na osnovu mrTRG (engl. *MRI-based tumour regression grade*) klasifikacije, povoljan odgovor (mrTRG1-2) zabeležen je kod 45,4% pacijenata. Nakon kliničke procene odgovora na neoadjuvantnu radiohemioterapiju (nCRT), hirurško lečenje je primenjeno kod 84% pacijenata, sa prosečnim intervalom od završenog neoadjuvantnog lečenja od 14 nedelja, a očuvanje sfinktera je uspešno postignuto kod 77,8% pacijenata. Poređenjem karakteristika bolesti inicijalno i nakon sprovedenog neoadjuvantnog i operativnog lečenja, zabeleženo je smanjenje veličine tumora (*downsizing* – smanjenje T kategorije bolesti) kod 73% pacijenata, i smanjenje stadijuma bolesti (*downstaging*) kod 80,9% pacijenata. U okviru ispitivane kohorte pacijenata, 33,3% imalo je inicijalno pozitivan EMVI status, što je bilo statistički značajno povezano sa slabijim odgovorom na neoadjuvantno lečenje ($p < 0,05$). Grupisanjem pacijenata sa patohistološkom kompletnom regresijom (engl. *pathologic Complete Response* - pCR) nakon sprovedenog operativnog lečenja i pacijenata uključenih u “*watch and wait*” program, zabeležena je stopa kompletnog odgovora od 33,3% pacijenata. Na patohistološkom uzorku biopsije, utvrđeno prisustvo mucinozne komponente unutar tumora bilo je statistički značajno povezano sa slabijim

odgovorom na neoadjuvantno lečenje ($p < 0,01$). U okviru ispitivanja inicijalnih hematoloških parametara, kod pacijenata sa početnom vrednošću bazofila manjom od $0,05 \times 10^9/L$ zabeležena je veća verovatnoća postizanja dobrog odgovora na neoadjuvantno lečenje ($p < 0,01$). Viši početni nivo eozinofila ($> 0,15 \times 10^9/L$), kao i apsolutni nivo monocita veći od $0,57 \times 10^9/L$, bili su povezani sa lošijim odgovorom na sprovedeno lečenje. Kombinovanjem različitih inicijalnih parametara, model sa najvećom prediktivnom tačnošću uključio je inicijalne apsolutne vrednosti eozinofila, bazofila i monocita.

Na osnovu sprovedene *in silico* analize objavljenih transkriptomskih setova podataka, identifikovani su geni potencijalni prediktori odgovora na neoadjuvantnu radiohemioterapiju: *IL6*, *CXCL9*, *CYBB* i *IDO1*. Značaj ovih gena u predikciji odgovora procenjen je u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, uz povećanje radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost*-a, koristeći kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu (engl. *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* - qRT-PCR). U okviru ispitivane kohorte statistička značajnost nije zabeležena u odnosu na ekspresiju *in silico* analizom odabranih gena (*IL6*, *CYBB*, *CXCL9*, *IDO1*) kada su poređeni pacijenti koji su dobro i pacijenti koji su slabije odreagovali na neoadjuvantno lečenje. Kada su poređenja izvršena u podgrupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje, značajno viša ekspresija *IDO1* uočena je kod pacijenata sa zabeleženim pCR (TRG1) u poređenju sa pacijentima sa TRG4 postoperativnom kategorijom ($p < 0,05$).

Naredni segment ove doktorske disertacije odnosi se na ispitivanje razlika u ishodima sprovedenog lečenja neoadjuvantnom radiohemioterapijom između kohorte ispitanika lečenih standardnim pristupom i kohorte ispitanika lečenih povećanom dozom zračne terapije. Upoređujući stope sfinkter-poštednih operacija između dve ispitivane kohorte, zabeležen je veći procenat očuvanja sfinktera u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije (77,8%), u poređenju sa kohortom ispitanika lečenih standardnim pristupom (62,5%), ali bez postignute statističke značajnosti. Poređenjem dve ispitivane kohorte, statistički značajno manji procenat prisustva perineuralne invazije (PNI), analizom postoperativnog resektata, zabeležen je u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije ($p < 0,01$). Analiza definitivnog postoperativnog stadijuma pokazala je statistički značajno više prisutnih nižih T kategorija bolesti (T0-2) ($p < 0,01$), negativnih N statusa ($p < 0,05$) i nižih stadijuma bolesti (I+II) ($p < 0,05$) u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. U kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije kod pacijenata sa sprovedenim operativnim lečenjem pCR je zabeležen kod 19% i 7,1% u kohorti ispitanika lečenih standardnim pristupom. Sa aspekta ovog parametra statistička značajnost nije zabeležena, osim pozitivnog trenda ($p = 0,06$). Poređenjem pojedinačnih TRG statusa između dve ispitivane kohorte zabeležena je statistički značajno veća zastupljenost boljih odgovora na sprovedeno lečenje u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije ($p < 0,05$). U odnosu na TRG status poređenjem grupe pacijenata koja je dobro odreagovala na nCRT (TRG1-2) i grupe pacijenata koja je slabije odreagovala na nCRT (TRG3-5) statistička značajnost nije zabeležena. Poređenjem dve ispitivane kohorte u odnosu na regresioni gradus karcinoma rektuma (engl. *Rectal Cancer Regression Grade* - RCRG) statistička značajnost je zabeležena kako poređenjem pojedinačnih RCRG kategorija ($p < 0,05$), tako i poređenjem pacijenata koji su dobro odreagovali (RCRG1), u odnosu na pacijente koji su slabije odreagovali na sprovedeno neoadjuvantno lečenje (RCRG2-3) ($p < 0,01$). Intenziviranje neoadjuvantnog lečenja u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije bilo je praćeno statistički značajno manjim procentom izolovanih limfnih čvorova u poređenju sa kohortom ispitanika lečenih standardnim pristupom ($p < 0,05$). Istraživanje je pokazalo statistički značajnu razliku u korist kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije kada je u pitanju smanjenje T kategorije, N kategorije i ukupnog stadijuma bolesti ($p < 0,01$).

I pored primene VMAT tehnike u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, kao tehnike poznate po svojoj superiornosti i mogućnosti zaštite okolnih organa pod rizikom (engl. *Organs At Risk* – OAR), stope nehematološke toksičnosti bile su slične između dve ispitivane kohorte. Statistički značajno veća učestalost urinarne toksičnosti, sa pojavom dizurije i

učestalog mokrenja, zabeležena je u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Analizom vremena pojave toksičnosti u toku lečenja zabeležena je statistički značajno ranija pojava toksičnosti u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije ($p < 0,01$).

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U ovom istraživanju u najvećem procentu su bili zastupljeni distalno lokalizovani karcinomi rektuma (80%). Ovi tumori predstavljaju izazov u lečenju zbog svoje anatomske blizine sa mezorektalnom fascijom, analnim kanalom, sfinkterskim kompleksom, kao i sa susednim organima. Podaci iz literature ukazuju na povećanu stopu lokalnih recidiva, i lošije stope preživljavanja u okviru grupe distalno lokalizovanih karcinoma rektuma (Wibe et al. 2004). Ovo ukazuje na značaj neoadjuvantne terapije kod ove lokalizacije LUKR, uključujući smanjenje veličine tumora, povećanje mogućnosti postizanja potpune resekcije sa negativnim hirurškim marginama i smanjenje rizika od pojave lokalnog recidiva bolesti (Wibe et al. 2004).

U studiji Taylor i saradnika uključena je grupa od 374 ispitanika sa LUKR sa ciljem procene prediktivne i prognostičke uloge inicijalnog statusa cirkumferentne resekcione margine (CRM) u odnosu na njenu zahvaćenost od strane tumora (udaljenost od ≤ 1 mm definisana kao pozitivan status). Kao rezultat istraživanja na osnovu MR pregleda pozitivna CRM je zabeležena kod 26% pacijenata (Taylor et al. 2014). U okviru ove doktorske disertacije, u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije direktna zahvaćenost CRM od strane tumora je registrovana kod 32% pacijenata. Veći procenat zahvaćenosti se može objasniti dominantno distalnom lokalizacijom karcinoma u ovom istraživanju.

U cilju adekvatne procene odgovora LUKR na nCRT uvedena je mrTRG klasifikacija za evaluaciju kontrolnog MR pregleda na osnovu poređenja sa inicijalnim nalazom (Siddiqui et al. 2016). U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije povoljan odgovor (mrTRG1-2) je zabeležen kod 45,4% pacijenata. Chen i saradnici u svom istraživanju kojim je obuhvaćeno 59 ispitanika sa LUKR lečenih nCRT stopa mrTRG1-2 kategorije je iznosila 33,9%, pri čemu je kontrolni MR pregled male karlice u proseku načinjen 6 nedelja po završenom neoadjuvantnom lečenju (Chen et al. 2023). Razlika u odnosu na ovo istraživanje može se objasniti povećanjem doze zračne terapije (50,4 Gy, naspram 54 Gy) i produženim intervalom do sprovođenja kontrolnog MR pregleda (6 nedelja, naspram 8 nedelja).

Nakon kliničke procene odgovora na nCRT hirurško lečenje je primenjeno kod 84% pacijenata, sa prosečnim intervalom od završenog neoadjuvantnog lečenja od 14 nedelja, a očuvanje sfinktera je uspešno postignuto kod 77,8% pacijenata. U studiji koja je obuhvatila samo distalno lokalizovane tumore rektuma, sa udaljenošću donjeg pola tumora do 5 cm od AKL, zabeležen je procenat sfinkter-poštednih operacija od 60% (Yang et al. 2019), što je komparabilno sa rezultatima ove doktorske disertacije.

Na osnovu definitivnog patohistološkog nalaza posebna pažnja je usmerena na parametre agresivnosti tumora imajući u vidu prethodna istraživanja koja su ukazala na lošiju prognozu bolesti kod pacijenata kod kojih na sprovedeno neoadjuvantno lečenje nije došlo do konverzije pozitivnog u negativni status datih parametara (Lord et al. 2022; Brown et al. 2006; Chand et al. 2015). U okviru parametara koji su povezani sa rizikom za relaps bolesti posebno se izdvajaju podstadijum T kategorije bolesti, CRM status, broj pozitivnih limfnih čvorova, ektranodalna ekstenzija, diferencijacija tumora, limfovaskularna invazija (LVI), ekstramuralna vaskularna invazija (EMVI) i PNI status (Glynne-Jones et al. 2017). Analizom rezultata ove doktorske disertacije, u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, poređenjem EMVI statusa na osnovu inicijalnog MR pregleda male karlice i izveštaja kontrolnog MR pregleda, zabeleženo je značajno smanjenje procenta pozitivnog nalaza (33,3%, naspram 2,7%). Na osnovu definitivnog postoperativnog patohistološkog nalaza kod pacijenata sa sprovedenim hirurškim lečenjem, vaskularna invazija je otkrivena kod 11,1% pacijenata.

U ovom istraživanju poređenjem karakteristika bolesti inicijalno i nakon sprovedenog neoadjuvantnog i operativnog lečenja zabeleženo je smanjenje veličine tumora (*downsizing* –

smanjenje T kategorije bolesti) kod 73% pacijenata, i smanjenje stadijuma bolesti (*downstaging*) kod 80,9% pacijenata. Na ovaj način postignutim povoljnim odgovorom kod najvećeg broja ispitanika pokazana je efikasnost pristupa povećanja radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost*-a, sa produženjem intervala između završene neoadjuvantne terapije i hirurškog lečenja. U studiji koja je obuhvatila 562 ispitanika sa LUKR kod kojih je sprovedena nCRT sa prosečnom radioterapijskom dozom od 45 Gy, smanjenje stadijuma bolesti je zabeleženo kod 57% pacijenata (Das et al. 2007). Ovo ukazuje na značaj primenjene doze zračne terapije na postignut lokalni odgovor. Upoređujući rezultate ove doktorske disertacije sa postojećom literaturom, zabeležene stope smanjenja veličine tumora i stadijuma bolesti znatno su veće od onih prijavljenih u mnogim prethodnim istraživanjima (Calvo et al. 2006; Magri et al. 2016; Fokas et al. 2017; Fokas et al. 2014).

Prema rezultatima ove doktorske disertacije, patohistološki utvrđeno prisustvo mucinozne komponente unutar tumora bilo je statistički značajno povezano sa slabijim odgovorom na neoadjuvantno lečenje ($p < 0,01$). Studija sprovedena od strane Simha i saradnika takođe je utvrdila da prisustvo mucina povećava rizik od veće rezidualne bolesti i lošije prognoze (Simha et al. 2014).

Uloga inicijalnih apsolutnih vrednosti bazofila već je ranije istražena kao prognostički faktor u kolorektalnom karcinomu. Pokazano je da postoji povezanost između nižeg nivoa bazofila i lošijeg preživljavanja, kao i agresivnijeg potencijala tumora (Liu et al. 2020). Uvidom u dostupne literaturne podatke, istraživanje sprovedeno u sklopu ove doktorske disertacije je prvo koje je ukazalo na prediktivnu ulogu inicijalnih vrednosti bazofila u domenu rektalnog karcinoma. Kod pacijenata sa početnom vrednošću bazofila manjom od $0,05 \times 10^9/L$ prisutna je veća verovatnoća postizanja dobrog odgovora na neoadjuvantno lečenje ($p < 0,01$).

Upoređujući literaturne podatke o prediktivnoj ulozi inicijalnih apsolutnih vrednosti eozinofila, predložena je njihova potencijalna uloga kao prediktivnog markera kod karcinoma pluća lečenog imunoterapijom, pri čemu se viši nivo detektuje kod pacijenata sa boljim ishodom lečenja (Caliman et al. 2022). Takođe je utvrđeno da je viši početni nivo eozinofila povezan sa boljim ishodom lečenja kada se imunoterapija primenjuje zajedno sa hemioterapijom kod pacijenata sa uznapredovalim melanomom (Ferrucci et al. 2017). Analizom rezultata ove doktorske disertacije, viši početni nivo eozinofila povezan je sa lošijim odgovorom. Dobijena diskrepancija u odnosu na literaturne podatke, može biti objašnjena razlikama u odnosu na tipove karcinoma i primenjene modalitete lečenja, kao i primenu radioterapije koja nije bila sastavni deo lečenja prethodno navedenih maligniteta.

Analizirajući početne apsolutne vrednosti monocita, prethodno je pokazana prediktivna uloga kod pacijenata sa karcinomom kolorektuma, pri čemu su viši nivoi detektovani kod pacijenata sa lošijim ishodom lečenja (Li et al. 2018). Isto je zabeleženo u ovom istraživanju, gde su apsolutni nivoi monocita veći od $0,57 \times 10^9/L$ bili povezani sa lošijim odgovorom na sprovedeno lečenje.

Nekoliko ranijih studija je takođe imalo za cilj istraživanje prediktivnih biomarkera u sličnim grupama ispitanika (Krauthamer et al. 2013; Lu et al. 2022). U okviru istraživanja Krauthamer i saradnika kao prediktori od značaja su analizirani nivoi serumskih albumina, hemoglobina i apsolutnih vrednosti krvnih ćelija u okviru monoinstitucionalne retrospektivne grupe pacijenata (Krauthamer et al. 2013). Studija u sklopu ove doktorske disertacije je zasnovana na prospektivnom ispitivanju kohorte ispitanika sa LUKR, koji su primali novu tehniku neoadjuvantne radiohemioterapije, što je omogućilo prikupljanje podataka u realnom vremenu, smanjujući potencijalnu pristrasnost izbora, kao i obezbeđujući pouzdanije rezultate. Lu i saradnici su istraživali prediktivnu ulogu laboratorijskih parametara nakon primenjene nCRT, dve nedelje pre operacije. Analizom su obuhvaćeni odnos fibrinogena i albumina, kao i odnos serumskog natrijuma i globulina (Lu et al. 2022). U studiji realizovanoj u sklopu ove doktorske disertacije, hematološki parametri su prikupljeni pre započinjanja neoadjuvantnog lečenja, obezbeđujući da oni odražavaju početno stanje, i time je isključen uticaj terapije na vrednosti hematoloških parametara. Kao model sa najvećom prediktivnom tačnošću zabeležen je model koji je uključio inicijalne apsolutne vrednosti eozinofila, bazofila i monocita. Takođe, kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije bila je homogenija, a faktori kao što su tehnika radioterapije, doze i hemioterapijski režimi su pažljivo kontrolisani, što je omogućilo sigurniju procenu uticaja određenih prediktora na odgovor

na terapiju. Kao fokus su definisani parametri koji su lako dostupni rutinskim analizama krvi, što može osigurati praktičnost i primenljivost prediktivnog modela u rutinskoj kliničkoj praksi. Sveobuhvatna evaluacija, koja je uključila inflamatorne hematološke parametre, radiološke karakteristike, patohistološke karakteristike i genetske markere, obezbeđuje holističko razumevanje potencijalnih prediktora povoljnog odgovora na neoadjuvantnu terapiju, pružajući dragocene uvide za personalizovane medicinske pristupe i meta-analize, uzimajući u obzir potencijalne razlike u specifičnostima populacija.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali statistički značajno veći broj nehematoloških toksičnosti u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Međutim, kada su klasifikovane toksičnosti na niskogradusnu (gradus 1 i 2) i visokogradusnu (gradus 3), nisu uočene statistički značajne razlike između dve ispitivane kohorte. U istraživanju sprovedenom od strane Bae i saradnika kojim je poređena primena *boost* doze sekvencijalnim pristupom 3D konformalnom tehnikom i simultanim pristupom IMRT tehnikom, zabeležena je statistički značajno niža urinarna toksičnost (poređeni pacijenti bez toksičnosti i sa toksičnošću gradus 1, u odnosu na pacijente sa zabeleženom toksičnošću gradus 3) kod primene IMRT-SIB tehnike, dok u odnosu na druge parametre razlika nije zabeležena (Bae et al. 2017). Razlika u odnosu na istraživanje u okviru ove doktorske disertacije se odnosi na odsustvo povećanja radioterapijske doze u IMRT-SIB grupi, i na taj način mogućnosti poređenja same tehnike bez uticaja ukupno aplikovane radioterapijske doze. I prethodne studije koji su imale za cilj određivanje stopa gastrointestinalne toksičnosti nisu zabeležile smanjenje toksičnosti primenom novijih tehnika planiranja zračne terapije, sa zabeleženom gastrointestinalnom toksičnošću od 52,5% (Hong et al. 2015), što je uporedivo sa rezultatima ovog istraživanja.

Upoređujući stope sfinkter-poštednih operacija između dve ispitivane kohorte, zabeležen je veći procenat pošteđe sfinktera u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije (77,8%) u poređenju sa kohortom ispitanika lečenih standardnim pristupom (62,5%). Međutim, statistička značajnost nije postignuta. Prethodno navedeni rezultati se slažu sa podacima iz literature, gde je studija koja je koristila VMAT-SIB tehniku (45 Gy/55 Gy) zabeležila stopu očuvanja sfinktera od 88%, mada je u toj studiji zabeležena veća početna zastupljenost stadijuma II bolesti (42%) u poređenju sa istraživanjem u sklopu ove doktorske disertacije (Yamashita et al. 2017).

Analiza definitivnog postoperativnog stadijuma pokazala je statistički značajno više prisutnih nižih T kategorija bolesti (T0-2), negativnih N statusa i nižih stadijuma bolesti (I+II) u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Poređenja sa podacima iz literature sugerišu da sama promena tehnike radioterapije, bez povećanja doze, kao rezultat ne doprinosi statistički značajnom smanjenju ovih parametara (Bae et al. 2017). U ovom istraživanju primećeno poboljšanje u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije može se pripisati uticaju VMAT-SIB tehnike uz povećanje radioterapijske doze zračenja.

U studiji koja je uključila 385 pacijenata sa LUKR kod kojih je sprovedena nCRT sa ukupnom dozom 50,4 Gy i hirurškim lečenjem u proseku 6 nedelja po sprovedenom neoadjuvantnom lečenju pCR je detektovan kod 10,4% pacijenata (Rödel et al. 2005). Studija koja je kao i u ovom istraživanju primenila VMAT-SIB tehniku sa povećanjem radioterapijske doze zabeležila je pCR kod 17% pacijenata (Yamashita et al. 2017). Ovi rezultati ukazuju na komparabilnost rezultata ove doktorske disertacije sa literaturnim podacima.

Smanjenje T kategorije bolesti (*downsizing*) u kohorti ispitanika lečenih standardnim pristupom postignuto je kod 35,5% pacijenata, što je uporedivo sa podacima iz literature kada je preoperativna radioterapija sprovedena korišćenjem 3D konformalne tehnike i doze od 50,4 Gy (Bae et al. 2017). Međutim, ovo istraživanje je pokazalo statistički značajnu razliku u korist kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije kada je u pitanju smanjenje T kategorije, N kategorije i ukupnog stadijuma bolesti. Ovo ističe pozitivan uticaj VMAT-SIB tehnike na terapijski odgovor tumora.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Marinković M, Stojanović-Rundić S, Stanojević A, Ostojić M, Gavrilović D, Janković R, Maksimović N, Stroggilos R, Zoidakis J, Castellví-Bel S, Fijneman RJA, Čavić M. Exploring novel genetic and hematological predictors of response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Front. Genet.* 2023; 14:1245594. doi: 10.3389/fgene.2023.1245594. (M21, IF 4,772)

Marinković M, Stojanović-Rundić S, Stanojević A, Tomašević A, Janković R, Zoidakis J, Castellví-Bel S, Fijneman RJA, Čavić M, Radulović M. Performance and Dimensionality of Pretreatment MRI Radiomics in Rectal Carcinoma Chemoradiotherapy Prediction. *J. Clin. Med.* 2024; 13, 421. doi: 10.3390/jcm13020421. (M21, IF 4,964)

Marinković M, Stojanović-Rundić S. The role of stereotactic body radiation therapy in the treatment of colorectal liver metastases. *Medicinski podmladak.* 2022; 73(1):17-24; doi: 10.5937/mp73-34773. (M52)

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija kandidata dr Mladena Marinkovića pod nazivom „Ispitivanje prognostičkih i prediktivnih kliničkih i molekularnih markera u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma neoadjuvantnom radiohemioterapijom primenom volumnog rotacionog planiranja zračne terapije i simultanog integrisanog *boost-a*“ predstavlja originalan, aktuelan i značajan naučni doprinos u oblasti ispitivanje uticaja kliničkih i genetskih parametara na uspešnost savremenog terapijskog pristupa u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma. Ciljevi ove disertacije su precizno definisani, dok su primenjene istraživačke metode savremene, prikladne i usaglašene sa aktuelnom naučnoistraživačkom praksom u navedenoj oblasti. Teza je strukturno organizovana kroz prikaz dve sadržajno komplementarne studije koje na sveobuhvatan, koherentan, ali i metodološki raznovrsan način obrađuju temu. Rezultati sprovedenih istraživanja predstavljani su u skladu sa postavljenim ciljevima i definisanim hipotezama, pregledno i sistematično, uz razumljiv i logično organizovan tekst i adekvatne tabelarne i grafičke prikaze. Interpretacija i diskusija rezultata realizovane su uz uporednu analizu sa odgovarajućim literaturnim izvorima i izvedeni su stručno i naučno relevantni zaključci. Ova disertacija daje dragocen uvid u preciznije razumevanje složenih mehanizama koji utiču na efikasnost radioterapijskog lečenja, kao i uticaja primene veće dnevne doze zračne terapije u predelu volumena tumora (simultanog integrisanog *boost-a*). Dodatno, identifikacija potencijalnih biomarkera odgovora na terapiju može imati važnu kliničku primenu za personalizovanu terapiju kod pacijenata sa lokalno uznapredovalim karcinomom rektuma. Disertacija predstavlja doprinos razumevanju faktora koji utiču na odgovor na terapiju, a primena nove tehnike radioterapije pokazuje potencijalne benefite u smanjenju veličine tumora i stadijuma bolesti. Ovakvo istraživanje doprinosi unapređenju pristupa lečenju ovog tipa karcinoma i prva je doktorska disertacija koja je analizira ishod primene veće dnevne doze zračne terapije u predelu volumena tumora u lokalno uznapredovalom karcinomu rektuma u Srbiji.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Mladena Marinkovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 08.04.2024.

Članovi komisije:

Mentori:

Prof. dr Velimir Marković

Doc. dr Suzana Stojanović-Rundić

Prof. dr Aleksandra Đurić Stefanović

N. Sav. dr sc. Milena Čavić

Komentor:

N. Sav. dr sc. Radmila Janković

Prof. dr Nataša Maksimović

Prof. dr Vesna Plešinac Karapandžić

Prof. dr Nebojša Manojlović
