

ИМЕНО:	
05	8342/B-3
СТАТУС:	СТАТУС:
СТАТУС:	СТАТУС:

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-385/30 од 14.05.2019. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата **Дејана Илића**, за израду докторске дисертације под називом:

„Дијагностички и прогностички значај концентрације серумског зиксина код оболелих од неситноћелијског карцинома плућа“

Чланови Комисије су:

- 1. Проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник;
- 2. Проф. др Драгана Јовановић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан;
- 3. Доц. др Милан Зарић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан.

На основу увида у приложени документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи:

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Дејан Илић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Дејан Илић рођен је 20.11.1978. године у Сокобањи, где је завршио основну школу и гимназију, природно-математички смер. Медицински факултет Универзитета у Нишу завршио је 2009. године, обавезни лекарски стаж обавио у Клиничком центру Ниш и Дому здравља Сокобања, а након тога положио стручни испит за доктора медицине пред комисијом Министарства здравља. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписао је 2009. године, изборно подручје Клиничка и експериментална интерна медицина, а усмени докторски испит положио 2015. године. Од фебруара 2010. године у сталном је радном односу као лекар на одељењу у Специјалној болници за плућне болести „Озрен“, Сокобања, тренутно на завршној години специјалистичких академских студија из области Интернистичке онкологије на Медицинском факултету Универзитета у Нишу. Члан је Лекарске коморе.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске дисертације

Наслов: „Дијагностички и прогностички значај концентрације серумског зиксина код оболелих од неситноћелијског карцинома плућа“

Предмет: Испитивање дијагностичког и прогностичког значаја концентрације зиксина у серуму болесника са неситноћелијским карциномом плућа (NSCLC).

Хипотезе:

1. Концентрација зиксина у серуму пацијената оболелих од NSCLC значајно се разликује од вредности добијених код испитаника у контролној групи;
2. Разлике у концентрацији зиксина у серуму зависе од хистолошког типа NSCLC;
3. Концентрација зиксина у серуму корелира са терапијским одговором оболелих од NSCLC.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Дејан Илић, објавио је рад *in extenso* у часопису категорије M23, у коме је први аутор, чиме је стекао услов за пријаву теме докторске дисертације.

1. **IIIć D**, Rančić M, Stoimenov Jevtović T, Petrović V, Petrović M. Zyxin expression levels in non-small cell lung cancer patients. *Vojnosanit Pregl.* 2019; doi: 10.2298/VSP180810017I. **M23**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Карцином плућа најчешћи је узрок умирања од малигних болести широм света, са више од 1,6 милиона смртних случајева годишње. Водећи је узрок смрти од малигних болести код мушкараца, док је код жена на другом месту. Процењује се да је током 2017. године у Европи NSCLC водећи узрок смрти од малигних болести код оба пола, са 24% код мушкараца и 15% код жена. NSCLC чини 80-90% свих карцинома плућа. Симптоми се често јављају у касном стадијуму болести када хируршка ресекција више није метода избора лечења.

Досадашњи покушаји раног откривања NSCLC, било да се ради о имуноцитохемичким методама или цитолошком прегледу спутума, нису дали очекиване резултате, нити су имали утицаја на стопу морталитета. Ранија истраживања покушала су да утврде значај туморских маркера из крви код плућног карцинома, неки од њих су CYFRA 21-1 (cytokeratin 19 fragment), CEA (carcinoembryonic antigen), SCCA (squamous cell carcinoma antigen) и NSE (neuron-specific enolase). Ниво селективности ових маркера за успешно откривање карцинома плућа није утврђен.

Упркос овим неуспесима, са развојем нових лабораторијских техника, тежи се идентификацији нових туморских маркера који ће бити детектабилни у раном стадијуму болести, чиме би се повећао проценат оболелих код којих је могуће спровести хируршко лечење NSCLC.

Напредовањем масене спектрометрије и увођењем метода попут дводимензионалне електрофорезе у гелу (2DE), ласерске десорпције/јонизације потпомогнуте матрицом (MALDI) или јонизације електрораспршењем (ESI), омогућено је протеомичко испитивање на стотине или чак хиљаде протеина и/или пептида. Омогућена је евалуација њихове експресије, функције, интеракција, посттранслационе модификације, али и њихове улоге као потенцијално специфичних маркера у одређеним болестима. На овај начин нађена је повећана концентрација серумског хаптоглобина (HP) у серуму NSCLC болесника, где се нарочито истиче дијагностичка вредност одређивања субјединице алфа, затим серумског амилоида алфа (SAA), ткивног инхибитора металопроотеиназе 2 (TIMP2), калпротектина у пљувачки и серуму, алфа-2-гликопротеина богатог леуцином у урину (LRG1), и гелсолина код дисеминације и метастазирања туморских ћелија. Повећан ниво гелсолина лош је прогностички знак.

Новија протеомичка истраживања Yeoun Jin Kim-а и сарадника детектују значајно повећане концентрације укупно 17 протеина у плазми пацијената са NSCLC, од којих

четири до сада нису описивани као туморски маркери код немикроцелуларног карцинома плућа (*Filamin-A*, P21333; *Moesin*, P26038; *Transaldolase*, P37837 и *Zyxin*, Q15942).

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај: Од студије се очекује да потврди присуство повишених вредности зиксина у серуму оболелих од неситноћелијског карцинома плућа у свим стадијумима болести, али и да укаже на евентуалне разлике у нивоима овог биомаркера код различитих хистолошких типова NSCLC. Веза између концентрације зиксина у серуму, одговора на специфичну онколошку терапију и укупног преживљавања указала би на евентуални прогностички значај овог фосфопротеина.

Циљеви истраживања: Основни циљ ове студије је да се испита дијагностички и прогностички значај серумског зиксина код оболелих од NSCLC.

У складу са овим основним циљем утврдили смо и конкретне задатке:

1. Испитати вредности зиксина у серуму оболелих од NSCLC;
2. Утврдити концентрације зиксина у серуму оболелих од различитих подтипова NSCLC;
3. Анализирати концентрације зиксина у серуму код оболелих од тумора различитог степена диферентованости;
4. Анализирати однос концентрација зиксина у серуму са клиничким параметрима испитиваних болесника (старост, пол, TNM стадијум);
5. Испитати сензитивност зиксина у серуму у одговору на хемиотерапију оболелих од узнапредовалог NSCLC;
6. Утврдити стопу преживљавања испитиваних болесника након две године праћења и њену повезаност са вредностима зиксина у серуму.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Скорија протеомичка истраживања детектовала су неколико протеина који до сада нису описивани као туморски маркери код немикроцелуларног карцинома плућа. Посебно је занимљив зиксин, члан породице протеина фокалних адхезија, који има улогу у ћелијској адхезији и ремоделовању цитоскелета. Раније је описивана његова улога у епително-мезенхимској транзицији код карцинома, као и улога у нисходној регулацији TGF- β , индукујући покретљивост ћелија. Сада је утврђено повећано присуство зиксина у плазми пацијената са NSCLC у сва четири стадијума болести, чиме се овај молекул издваја као потенцијални биомаркер за рану дијагнозу неситноћелијског карцинома плућа.

Ова студија би потврдила или оспорила дијагностички значај зиксина код NSCLC. Праћењем клиничких параметара, одговора на терапију и анализом преживљавања испитала би се сензитивност зиксина као предиктора терапијског одговора и прогнозе код болесника са NSCLC.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

У складу са основним циљем и утврђеним задацима истраживања планирано је спровођење проспективне, клиничке, кохортне студије у Клиници за пулмологију Клиничког центра Ниш и Лабораторији за функционалну геномику и протеомику Медицинског факултета Универзитета у Нишу. Истраживање ће бити спроведено уз поштовање Хелсиншке декларације, сви субјекти студије добровољно ће потврдити спремност да учествују у истраживању у форми информисаног пристанка, одобреног од стране Етичког одбора КЦ Ниш.

2.7.2. Популација која се истражује

У студију ће бити укључено укупно 120 пацијената оба пола, старосне доби 18 и више година, хоспитализованих у Клиници за пулмологију КЦ Ниш. Субјекти студије биће подељени у две групе. Прву групу чиниће 90 болесника са патохистолошки потврђеном дијагнозом NSCLC у свим стадијумима болести. Контролна група ће бити састављена од 30 испитаника са дијагнозама других плућних болести код којих се на основу анамнестичких, клиничких, радиолошких и биохемијских параметара са великом вероватноћом може искључити постојање раније или актуелне малигне болести. Испитаници из прве (NSCLC) групе биће праћени током двогодишњег периода од момента постављања дијагнозе.

2.7.3. Узорковање

Критеријуми за укључивање у прву (NSCLC) групу:

1. Патохистолошка верификација NSCLC у свим клиничким стадијумима;
2. Одлука Конзилијума за пулмолошку онкологију КЦ Ниш да се лечење болесника спроведе хируршком ресекцијом или да се започне са применом хемиотерапије, односно комбинацијом хемио и радиотерапије.

Критеријуми за искључивање из прве (NSCLC) групе:

1. Истовремено постојање малигне болести друге локализације или историја раније малигне болести;
2. Патохистолошки доказан ситноћелијски карцином плућа;
3. Одлука Конзилијума за пулмолошку онкологију КЦ Ниш да се услед лошег општег стања (ECOG ≥ 3) и/или постојања коморбидитета у лечењу пацијента примени симптоматска терапија или само палијативна зрачна терапија на предео угрожених регија.

Критеријуми за укључивање у контролну групу:

1. Пацијенти са другим пулмолошким дијагнозама који по животној доби, полу, социодемографским карактеристикама, коморбидитетима, факторима ризика и штетним животним навикама у највећој могућој мери одговарају испитаницима из прве групе.

Критеријуми за искључивање из контролне групе:

1. Историја раније или постојање актуелне малигне болести;
2. Раније лечење цитотоксичном терапијом, радиотерапијом, хормонском терапијом или било којим другим антитуморским агенсом.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

1. Код свих пацијената ће бити примењен стандардизован дијагностички протокол који подразумева прикупљање свих релевантних података, укључујући информације о социодемографским карактеристикама, коморбидитетима, факторима ризика и штетним животним навикама, а такође и физички преглед, електрокардиограм, стандардну радиографију грудног коша, ехосонографију абдомена, а по потреби и друге раположиве дијагностичке поступке у циљу адекватног одређивања стадијума NSCLC у првој групи испитаника (компјутеризована томографија грудног коша и абдомена, сцинтиграфија скелета, компјутеризована томографија и магнетна резонанца ендокранијума, позитрон емисиона томографија, торакоцентеза, перикардиоцентеза), у складу са Националним водичем добре клиничке праксе за карцином плућа.
2. За одређивање класичних лабораторијских (хематолошких и биохемијских) параметара и маркера инфламације, користиће се стандардне биохемијске и имунохемијске методе.
3. У NSCLC групи пратиће се патохистолошки и имунохистохемијски показатељи важни за прецизно одређивање хистолошког типа и степена диференцијације тумора.
4. Пре доношења одлуке о лечењу, код пацијената са NSCLC процениће се стадијум болести применом TNM класификације, уз прецизно дефинисање *target* и *non-target* лезија (RECIST 1.1).
5. Одговор на спроведено лечење код NSCLC болесника са локално узрапредовалом или метастатском болешћу биће процењен након четвртог циклуса хемиотерапије евалуацијом претходно дефинисаних *target* и *non-target* лезија и тражењем потенцијалних нових малигнух лезија. Према дефинисаним критеријумима (RECIST 1.1) терапијски одговор може бити процењен као комплетан одговор (CR), парцијални одговор (PR), стабилна болест (SD) или прогресивна болест (PD).
6. Пратиће се опште стање пацијената према скали *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) одређивањем *Performance Status-a* (PS) сваког испитаника у NSCLC групи.

7. За одређивање концентрације зиксина у серуму узорковаће се венска крв антекубиталном венепункцијом, код операбилних NSCLC болесника (I-IIIА стадијум) пре хируршког лечења, а код болесника са узнапредовалом болешћу (инооперабилни IIIА, IIIБ, IV стадијум) пре отпочињања хемиотерапије и након примљеног четвртог циклуса хемиотерапије. У контролној групи узорковање ће се обавити истовремено са узорковањем крви за рутинске лабораторијске анализе. Након два сата на собној температури, серум ће бити центрифугиран (на 1000g) у трајању од 15 минута, а одмах потом складиштен и чуван на температури -80°C до коначне анализе. За квантитативну детерминацију концентрација хуманог зиксина користиће се доступан ELISA тест: Cusabio Human Zyxin (ZYX) ELISA Kit, Catalog Number CSB-EL027165HU (Cusabio Technology LLC, 8400 Baltimore Avenue, Room 332 College Park, MD 20740, USA).

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Величина узорка израчуната је помоћу PASS 16.0.4 програма, за $\alpha = 0,05$ и снагу студије 0,9 за t -тест два независна узорка који дозвољава неједнакост варијанси. Задовољавајућа величина узорка у студији по задатим критеријумима била би $n=30$.

2.7.6. Статистичка анализа

За статистичку анализу података користиће се програмски језик R, верзија 3.3.1, изграђена за архитектуру процесора $\times 64$, са следећим пакетима: *WRS2*, *effsize*, *pastecs*, *survival*, *onewaytests*. Нумеричке вредности обележја посматрања биће приказане као аритметичка средина \pm стандардна девијација, док ће номиналне вредности обележја посматрања бити приказане као апсолутне учесталости (%). Нормалност расподеле биће испитана *Shapiro-Wilk*-овим тестом и визуелним методама укључујући визуелну инспекцију хистограма, као и коришћење QQ' дијаграма за испитивање нормалности, асиметрије и спљоштености. Тестирање хипотезе о различитим вредностима зиксина у серуму код NSCLC пацијената и пацијената у контролној групи вршиће се *Welch*-овом модификацијом t -теста. Због могућег кршења претпоставке нормалности, неједнаких величина узорака, као и различитих дистрибуција поређених узорака, што би онемогућило употребу непараметарских тестова, биће примењена робустнија верзија *Welch*-овог теста са *Yuen*-овом модификацијом и *Vilkoks*-овом техником *Monte Carlo* поновног вишеструког стохастичног узорковања, са параметрима $\gamma = 20$ и $B=2000$. Величина ефекта биће приказана *Cohen*-овим d и вредношћу $\hat{\xi}$ коју *Vilkoks* и *Tian* препоручују за тестове ове природе уместо *Cohen*-овог d . Иста методологија биће примењена приликом тестирања хипотезе о различитим вредностима зиксина у серуму код различитих хистолошких типова NSCLC. За тестирање хипотеза о различитим вредностима зиксина у различитим клиничким стадијумима болести или код различитих степена диференцијације тумора биће примењен робустнији еквивалент ANOVA теста са $\gamma = 20$ и $B=2000$, без захтевања претпоставке нормалности

или хетероскедастичности. Утицај хемиотерапијског одговора на ниво зиксина у серуму код пацијаната са узнатредовалим NSCLC, у две временске тачке, биће испитан комбинованом анализом варијансе. У случају да је нарушена претпоставка о хомогености варијансе, иста ће бити испитана *Welch*-овим, *Brown-Forsythe*-овим и *Yuen*-овим тестом. Специфичност теста биће приказана генерисањем ROC криве. За анализу појаве догађаја користиће се *Kaplan-Meier*-ова крива преживљавања а поређење између група вршиће се помоћу *log rank* теста. Све анализе ће бити процењене на нивоу статистичке значајности од $p < 0,05$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Од студије се очекује да потврди повишену концентрацију зиксина у серуму оболелих од NSCLC у свим стадијумима болести, да испита евентуалне разлике у концентрацијама овог биомаркера код различитих хистолошких типова NSCLC и анализира његов евентуални прогностички значај.

Резултати докторске дисертације треба да покажу колика је специфичност овог теста и помогну у позиционирању зиксина као биомаркера за рано откривање неситноћелијског карцинома плућа. Коначни циљ је повећати проценат препознатих агресивних форми NSCLC у раним стадијумима, што би омогућило да се раном хируршком ресекцијом утиче на укупно преживљавање код ове тешке болести.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Проспективном, кохортном, клиничком студијом биће обухваћено 120 пацијената оба пола од којих је 90 болесника са утврђеном дијагнозом NSCLC. Контролну групу чиниће 30 пацијената са дијагнозама других плућних болести. За одређивање нивоа зиксина у серуму узорковаће се венска крв, код болесника са операбилним NSCLC пре операције, а код узнатредовалог NSCLC пре отпочињања хемиотерапије и након примљеног четвртог циклуса хемиотерапије. Концентрација зиксина одређиваће се доступним ELISA тестовима.

Очекује се да резултати студије потврде везу између повећане концентрације зиксина у серуму и неситноћелијског карцинома плућа и да покажу колики је потенцијални значај овог биомаркера код различитих подтипова NSCLC, различитих степена диференцијације тумора и различитих клиничких параметара.

Од нарочите важности је испитивање дијагностичког значаја серумског зиксина у субпопулацији пацијената са раним стадијумом, за које је резервисано лечење комплетном ресекцијом NSCLC. Веза између концентрације зиксина у серуму пацијената са узнатредовалим NSCLC, степена одговора на специфичну онколошку терапију и укупног преживљавања указивала би на евентуални прогностички значај овог фосфопротеина.

3. Предлог ментора

За ментора предлаже се проф. др Марина Петровић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина. Проф. др Марина Петровић испуњава услове за менторе докторских дисертација у складу са стандардом 9 за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

Компетентност ментора

Радови проф. др Марине Петровић у вези са темом докторске дисертације:

1. Petrović M, Bukumirić Z, Zdravković V, Mitrović S, Atkinson HD, Jurišić V. The prognostic significance of the circulating neuroendocrine markers chromogranin A, pro-gastrin-releasing peptide, and neuron-specific enolase in patients with small-cell lung cancer. *Med Oncol.* 2014; 31(2):823.
2. Petrović M, Mitrović S, Stanković V, Jurišić V, Atkinson H.D. Neuroendocrine Markers–Useful Predictors of Therapeutic Responses in Non-resectable Non-small Cell Lung Cancer. *Lab Medicine.* 2012; 43(2):6-10.
3. Petrović M, Baskić D, Banković D, Ilić N. Neuroendocrine differentiation as an indicator of chemosensitivity and prognosis in non-small cell lung cancer. *Biomarkers.* 2011; 16(4):311-320.
4. Petrović M, Ilić N, Lončarević O, Čekerevac I, Lazić Z, Novković Lj, Čupurdija V, Kostić G. Risk factors for brain metastases in surgically staged IIIA non-small cell lung cancer patients treated with surgery, radiotherapy and chemotherapy. *Vojnosanit Pregl.* 2011; 68(8):643-649.
5. Petrović M, Ilić N, Baskić D. Značaj neuroendokrinih markera u odgovoru na lečenje i preživljavanje bolesnika s odmaklim nesitnoćelijskim karcinomom pluća. *Srp Arh Celok Lek.* 2010; 138(1-2):37-42.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Клиничка и експериментална интерна медицина

5. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник;
2. Проф. др Драгана Јовановић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан;
3. Доц. др Милан Зарић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан.

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

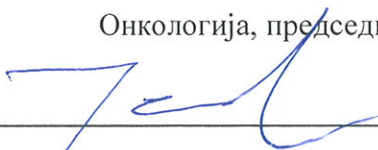
На основу увида у досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Дејана Илића, Комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.

Предложени предмет истраживања је веома актуелан и добијени резултати могу дати велики допринос процени значаја одређивања зиксина као потенцијално новог и до сада клинички непотпуно испитаног биомаркера за рану дијагностику, прогнозу и скрининг NSCLC. Ради се о добро планираној и на науци заснованој студији чији очекивани резултати имају потенцијал за публикавање у релевантним часописима. Према сугестијама чланова Комисије јасније је формулисан наслов теме и прецизније дефинисани циљеви истраживања.


Комисија предлаже Наставно–научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Дејана Илића, уз корекцију наслова, тако да гласи: „**Дијагностички и прогностички значај концентрације зиксина у серуму код оболелих од неситноћелијског карцинома плућа**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

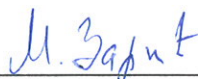
Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник



Проф. др Драгана Јовановић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан



Доц. др Милан Зарић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан



У Крагујевцу, 22.05.2019. године