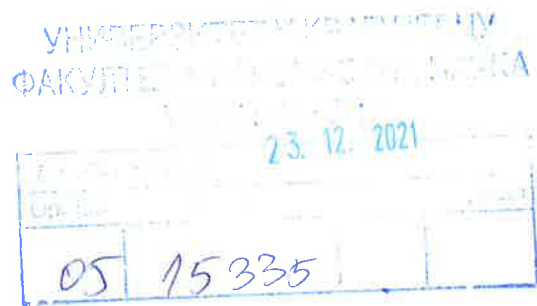


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



**ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ НАУЧНЕ ЗАСНОВАНОСТИ  
ТЕМЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

**1. Одлука Наставно научног већа**

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-888/21 од 10.11.2021. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Душица Петровић Родић, под називом:

“Корелација локалне експресије тимидилат-синтазе и ендоглина са системским вредностима ендоглина и TGF- $\beta$  оболелих од колоректалног карцинома”

Чланови су:

1. **Проф. др Иван Јовановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Имунологија и микробиологија и ванредни професор за ужу научну област Онкологија, председник
2. **Доц. др Немања Јовичић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан
3. **Доц. др Весна Шкулегић**, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Патологија, члан

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

## **2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације**

### **2.1. Кратка биографија кандидата**

Др Душица Петровић Родић, рођена је у Крагујевцу, 29.01.1980 године. Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу завршила је 2006 год, након чега је обавила приправнички лекарски стаж и положила стручни испит за доктора медицине пред испитном комисијом Министарства здравља Републике Србије. Од 4. јуна 2008 год. запослена је у Центру за патолошко-анатомску дијагностику, УКИЦ “Крагујевац”, првобитно у својству клиничког лекара, а Специјалистичке студије из области Патолошка анатомија је започела октобра 2010 год. на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Исте је завршила јула 2015 год, при чему је стекла звање лекар специјалиста - патолог. Студент је Докторских Академских студија на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу од октобра 2008 год, изборно подручје Онкологија, а јула 2010 год. положила усмени докторандски испит са оценом 10 (десет).

До сада је објавила укупно 9 радова публикованих у иностраним и домаћим часописима, од којих 5 са SCI листе (у једном први аутор).

### **2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе**

**Наслов:** “Корелација локалне експресије тимидилат-синтазе и ендоглина са системским вредностима ендоглина и TGF- $\beta$  оболелих од колоректалног карцинома”

**Предмет:** У овој студији испитиваће се локална експресије тимидилат синтазе (TS) и ендоглина (CD105) у ткиву пацијената са колоректалним карциномом (CRC), након хируршке ресекције дебелог црева, системске вредности ендоглина (CD105) и TGF- $\beta$  преоперативно и постоперативно, анализа корелације између предиктивних фактора и утврђивање могућег прогностичког значаја те корелације у циљу изналажења предиктивних фактора који би могли да предвиде туморски одговор на примењену терапију и тиме се омогући индивидуализација третмана и циљана антитуморска терапија

#### **Хипотезе:**

1. Постоји корелација степена експресије и вредности испитиваних биомаркера у серумима са патолошким стадијумом болести.
2. Постоји корелација набројаних параметара са микроскопским карактеристикама тумора (хистолошки градус, нуклеарни градус, туморски лимфоцитни инфилтрат, дезмоплазија, некроза).
3. Степен експресије маркера корелира са макроскопским манифестацијама, локализацијом, полом и старосном доби.

### 2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у часопису категорије M23, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

**Petrovic Rodic D**, Kastratovic T, Jovanovic D, Markovic V, Stojanovic J, Jovanovic D. Lymphoma of the uterine cervix-a rare clinical presentation: a case report. *Vojnosanit Pregl.* 2021; doi: 10.2298/VSP210707080P. **M23**

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Према најновијој Globocan бази података из 2020 године, CRC (од енгл. Colorectal carcinoma) се по инциденци обољевања налази на трећем месту код мушкараца (иза карцинома плућа и простате), а на другом месту код жена (иза карцинома дојке). CRC је “хируршко обољење“ јер се ресекција колоне примењује у 92%, а ректума у 84% оболелих. Циљ хируршке интервенције је комплетна ексцизија, а ресецирани сегмент је кључан за патохистолошку анализу која обезбеђује параметре пресудне за постоперативно праћење, третман и процену исхода болести. Унапређење сазнања о молекулским и ћелијским процесима и откривање нових биомакера је важно за рану дијагнозу, предвиђање и прогнозу. Све већи интерес научне јавности усмерава се на испитивања клиничко- морфолошких параметара и појаве експресије појединих туморских маркера као значајних фактора у онкогенези. Велики значај се придаје одређивању биомаркерима на основу чијег се присуства или одсуства може предвидети одговор на постоперативну хемиотерапију. Један од маркера хемиосензитивности је експресија TS за коју се показало да корелира са резистенцијом на 5-флуороурацил (5-FU). 5-FU је хемиотерапеутик првог реда за узрапредовале стадијуме CRC, а механизам деловања овог лека је инхибиција ензима. Метастатско ширење обезбеђује добро развијена мрежа лимфних и крвних судова субмукозе. Folckman је 1971 године први поставио хипотезу да је раст тумора завистан од туморске ангиогенезе. Маркери и фактори ангиогенезе могу бити важни у прогнози малигних тумора. CD105 као маркер ендотелних ћелија у инвазивном тумору и представља идеалну мету за примену антиангиогенетске терапије, уз то је и добар прогностички показатељ. Различите студије су показале да је сензитивнији и специфичнији од других маркера.

## **2.5. Значај и циљ истраживања**

### **Значај студије**

С обзиром да је метастазирање вишестепени процес, сматра се да одређивање више од једног маркера, у овом случају TS и CD 105 може послужити за боље разумевање прогресије тумора у циљу бољег разумевања туморске прогресије и одређивању прогнозе у појединачном случају.

Резултати овог истраживања би могли да укажу на потенцијални ризик за прогресију CRC што је од значаја у планирању лечења. Очекивани резултати су да високе вредности TS и CD 105 корелирају са узрапредовалом болешћу и појавом метастаза у регионалним лимфним чворовима.

## **2.6. Веза са досадашњим истраживањима**

У литератури је познато да је ензим TS укључен у биосинтезу ДНК и главни је циљ за терапију 5-FU, чији је механизам деловања преко инхибиције TS. Према досадашњим истраживањима експресија TS корелира са резистенцијом на 5-FU. Мета анализе указују да високе вредности TS предвиђају лош исход.

Ендоглин (CD105) је део рецепторског комплекса за TGF- $\beta$  и 3 молекула који су бифункционални регулатори ћелијског раста и стимулишу пролиферацију мезенхималних, а инхибишу пролиферацију епителних ћелија, а настају у туморској ангиогенези.

Различите студије су доказале да је сензитивнији и специфичнији од досад употребљаваних маркера.

Према досадашњим сазнањима ендоглин (CD105) је коришћен као маркер у детекцији ендотелних ћелија у инвазивном тумору, представља идеалну мету за примену антиангиогенетске терапије и добар је прогностички показатељ.

## **2.7. Методе истраживања**

### **2.7.1. Врста студије**

Планирана је ретроспективно-проспективна, клиничко-експериментална студија.

### **2.7.2. Популација која се истражује**

У овој студији укључено је 128 оболелих од CRC-а, мушког и женског пола. Сви оболели су оперисани у Хируршкој Клиници, УКИЦ „Крагујевац” у периоду од 2007. до 2014 године. За све пацијенте урадиће се имунохистохемијска анализа у Центру за патолошко-анатомску дијагностику, УКИЦ ”Крагујевац”, уз одобрење Етичког одбора

УКЦ “Крагујевац”. Од 128 оболелих, узорковани серуми 60 оболелих (40 серума пре операције и 20 серума, пре и после операције), биће анализирани квантитативном ELISA техником у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Критеријум за укључивање у овом истраживању биће патохистолошки верификована дијагноза аденокарцинома дебелог црева.

Критеријуми за искључивање у овом истраживању биће непотпуни клинички подаци, пацијенти са синхроним и метахроним туморима, популација млађих од 18 година, хроничне инфламацијске и аутоимунске болести, пацијенти који су на дуготрајној терапији антиинфламацијским лековима.

### **2.7.3. Узорковање**

За болеснике са CRC који су примарно лечени хируршки биће испитивана имунохистохемијска експресија TS, ендоглина (CD105) и преоперативно и постоперативно ће се одређивати ниво ендоглина (CD105) и TGF- $\beta$  за одређен број пацијената (40 пацијената преоперативно и 20 пацијената преоперативно и постоперативно). Узорковање крви вршиће се у јутарњим часовима, преоперативно, када ће се узети 10 ml венске крви и десетог постоперативног дана у истој количини, након чега ће се квантификовати ниво ендоглина (CD105) и TGF- $\beta$  ELISA методом у Центру за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Хематоксилин–Еозин (ХЕ) и имунохистохемијске методе спровешће се у Центру за патолошко-анатомску дијагностику УКЦ „Крагујевац“ у Крагујевцу. У рутинској обради препарата, узорци ткива се фиксирају у 4% неутралном пуферисаном раствору формалина, у току 24h, на собној температури. Након фиксације, следи дехидратација кроз серију алкохола растуће концентрације (70%, 96% и 100%), просветљивање у ксилолу, калуљење у парафин, сечење микротомом на дебљину од 4  $\mu$ m., бојење Наemotoxylin-ом, просветљивање у раствору еозина и монтирање на плочице. Имунохистохемијске методе користе обележена антитела као специфичне реагенсе за детекцију антигена ин ситу и омогућавају визуелизацију дефинисаних антигена у ткивним пресецима, везивањем антитела за специфичне регионе антигена тзв. епитопе. Процедура имунохистохемијског бојења подразумева поступке демаскирања антигена, блокирања ендogene пероксидазе, инкубирања препарата са примарним антисерумом и поступак извођења имунохистохемијске методе - LSAB+. За детекцију TS примениће се антитело TS 106 и за ендоглин антитело CD105 са високо сензитивном специфичном стрептавидин – биотин имунохистохемијском методом (LSAB+) у којој је стрептавидин обележен пероксидазом. За примењена антитела користиће се позитивна контрола (позитивна реакција у околном очуваном ткиву). Као негативна контрола користиће се исечци ткива код којих ће се у току имунохистохемијског третмана уместо примарног антитела користити пуфер PBS.

#### 2.7.4. Варијабиле које се мере у студији

- **Независне варијабле:** Демографске карактеристике болесника- године живота, пол, хистолошки тип тумора, локализација тумора, стадијум примарног тумора, метастазе у регионалним лимфним чворовима, метастазе у удаљеним органима, хистолошки градус тумора, нуклеарни градус тумора, дезмоплазија, некроза, лимфоцитни инфилтрат, васкуларна инвазија, инвазија лимфних судова, перинеурална инвазија, макроскопски изглед тумора
- **Зависне варијабле:** Експресија TS, вредност MVD, системска вредност CD105, системска вредност TGF- $\beta$ .

За свих 128 оболелих од CRC-а који су примарно лечени хируршки биће испитивана имунохистохемијска експресија TS и CD105, а за 60 оболелих од 128 ће се преоперативно и постоперативно одређивати ниво системске вредности CD105 и TGF- $\beta$ . Процена резултата експресије TS ће се заснивати на одређивању степена експресије и биће подељена у две групе: а) одсуство експресије < 20% а) присуство експресије > 20% туморских ћелија је позитивно и на основу интензитета бојења: а) 0 – одсутан и 1 – слаб. 0,1 тумачиће се као негативан налаз б) 2 – умерен и 3 – јак. 2, 3 тумачиће се као позитиван налаз. Финална класификација добија се сабирањем степена експресије и интензитета бојења: без експресије (0), слаба експресија (1), јака експресија (2 и 3). У овом истраживању ће се квантификовати цитоплазматска експресија. За процену степена ангиогенезе у овој студији биће коришћена имунохистохемијска анализа са антителим ендоглин (CD 105) који је маркер ендотелних ћелија. Анализа ће бити вршена бројањем крвних судова у зони са њиховом највећом густином („hot spots”). Користиће се препоруке које је дао Weinder о величини видног поља и начину бројања. Места највеће густине крвних судова ће бити одређена на малом микроскопском увећању (x40). Након тога бројање појединачних крвних судова радиће се на средњем микроскопском увећању(x200). У резултате ће се убрајати комплетни крвни судови и траци ендотелних ћелија и појединачне ендотелне ћелије. Лумен крвних судова није потребан као ни присуство еритроцита. Бројање ће спровести два испитивача, а уколико је разлика већа од 10 % биће укључен и трећи испитивач. Средња вредност добијена бројањем у 3 видна поља биће коначан резултат MVD (CD105 експресије) за испитаника. Након добијених података о броју крвних судова за сваког болесника понаособ, израчунаће се медијана у односу на коју ће болесници бити подељени у две групе: болесници са ниским степеном ангиогенезе (број крвних судова у туморском ткиву мањи од вредности медијане) и болесници са високим степеном ангиогенезе (број крвних судова у туморском ткиву већи од вредности медијане).

**2.7.5. Снага студије и величина узорка:** Студијски узорак од 128 испитаника је израчунат на основу података о вредностима MVD публикованих у студијама сличног

дизајна узимајући алфа као 0.05 и снагу студије 0.8 за Студентов Т тест поредећи групе (у оба смера), према статистичком програму G Power\*3.

### **2.7.6. Статистичка обрада података**

Значење испитиваних варијабли (појединачно и у комбинацији) приказаше се након статистичке обраде добијених резултата код 128 пацијената помоћу комерцијалног пакета SPSS (*верзија 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL*). У анализи добијених резултата најпре ће бити коришћена дескриптивна статистика за опис општих карактеристика узорка: апсолутни бројеви и пропорције (фреквенције, проценти), мере централне тенденције (аритметичке средине) и мере варијабилитета (стандардна девијација). Нормалност расподеле биће евалуирана Колмогоров-Смирнов-им тестом. За поређење средњих вредности променљиве двеју популација користиће се независни Т тест, Kruskal-Wallis-ов и Mann-Whitney -јев тест. За поређење средњих вредности променљиве више популација користиће се Анализа варијанси. Испитивање зависности две описне променљиве реализоваће се помоћу Ни-квадрат теста и Fisher-овог теста. Зависности две нумеричке променљиве испитиваће се помоћу Pearson- овог и Spearman -овог коефицијента корелације. Испитивање утицаја више променљивих на бинарну променљиву урадиће се помоћу мултиваријантне бинарне логистичке регресије. Могућност да нека променљива буде маркер испитиваће се помоћу ROC криве, при чему ће се, за погодно утврђен cut-off, одређивати сензитивност и специфичност. P- вредности  $<0,05$  сматраће се статистички значајним.

### **2.8. Очекивани резултати докторске дисертације**

С обзиром да је метастазирање вишестепени процес, сматра се да одређивање више од једног маркера, у овом случају TS и CD105 може послужити за боље разумевање прогресије тумора и одређивању прогнозе у појединачном случају. Резултати овог истраживања би могли да укажу на потенцијални ризик за прогресију CRC што је од значаја у планирању лечења. Очекивани резултати су да високе вредности TS и CD105 корелирају са узрапредовалом болешћу и појавом метастаза у регионалним лимфним чворовима. Очекујемо да ће се на основу резултата овог истраживања доћи до јасно дефинисаних параметара који би применом у клиничкој пракси омогућили фокусирано спровођење антитуморског третмана.

## 2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Предмет истраживања ове студије је утврђивање корелације клиничко- морфолошких параметара и нивоа локалне експресије тимидилат-синтазе (TS) и ендоглина (CD105), системских вредности ендоглина (CD105) и TGF- $\beta$  са патохистолошким карактеристикама, макроскопским манифестацијама, локализацијом, полом, старосном доби у болесника са колоректалним карциномом, у циљу изналажења предиктивних фактора који би могли да предвиде туморски одговор на примењену терапију и тиме се омогући индивидуализација третмана и циљана антитуморска терапија. Истраживање ће бити спроведно као клиничко-експериментална студија која ће обухватити патохистолошки материјал 128 пацијената након хируршке ресекције. Од 128 оболелих, узорковани серуми 60 оболелих (40 серума пре операције и 20 серума, пре и после операције). Патохистолошки материјал ће бити имунохистохемијски анализиран ради утврђивања нивоа експресије TS и ендоглина (CD105), а ниво вредности ендоглина (CD105) и TGF- $\beta$  у серуму одредиће се ELISA методом. Подаци о полу, старости болесника, локализацији тумора, TNM стадијуму болести, патохистолошким параметрима биће коришћени из онколошких протокола Центра за патолошко-анатомску дијагностику, УКЦ „Крагујевац“. Циљ ове студије је идентификација прогностичких параметара чиме се може избећи нефокусиран приступ у досадашњој примени постоперативне хемиотерапије и омогућити индивидуализација антитуморског третмана.

## 3. Предлог ментора

За ко-менторе се предлажу:

1. **Проф. др Слободанка Митровић**, ванредни професор Факултета Медицинских наука у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка анатомија
2. **Др Данијела Цветковић**, Научни сарадник Института за информационе технологије у Крагујевцу, за ужу научну област Биологија

**Проф. Др Слободанка Митровић** поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

**НС Данијела Цветковић** поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.



### 3.1. Компетентност ко-ментора

Радови проф. др Слободанке Митровић који су у вези са темом докторске дисертације:

- 1) Pavlovic M, Jurisevic M, Gajovic N, Mitrovic S, Jovanovic M, Radosavljevic G, Pantic J, Radovanovic D, Arsenijevic N, Jovanovic I. IL-32 expression associates with lymph vessel invasion in intestinal type of gastric cancer. *Vojnosanit Pregl.* 2018; doi: 10.2298/VSP180727158P
- 2) Stankovic M, Ljujic B, Babic S, Maravic-Stojkovic V, Mitrovic S, Arsenijevic N, Radak D, Pejnovic N, Lukic ML. IL-33/IL-33R in various types of carotid artery atherosclerotic lesions. *Cytokine.* 2019;120:242-250.
- 3) Pavlovic M, Gajovic N, Jurisevic M, Mitrovic S, Radosavljevic G, Pantic J, Arsenijevic N, Jovanovic I. Diverse Expression of IL-32 in Diffuse and Intestinal Types of Gastric Cancer. *Gastroenterol Res Pract.* 2018;2018:6578273.
- 4) Milosavljevic MZ, Jovanovic IP, Pejnovic NN, Mitrovic SL, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ, Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget* 2016;7(14):18106-15
- 5) Milosevic B, Cvetkovic A, Ninkovic S, Markovic S, Mitrovic S, Stojanovic B, Radunovic A, Vulovic M and Cvetkovic D. Mammaglobin expression in tissue as a predictor of breast carcinoma aggressiveness. *Vojnosanit Pregl.* 2019; doi: 10.2298/VSP190129046M.

Радови НС Данијеле Цветковић који су у вези са темом докторске дисертације:

- 1) Nikodijević DD, Jovankić JV, Cvetković DM, Anđelković MZ, Nikezić AG, Milutinović MG. L-amino acid oxidase from snake venom: Biotransformation and induction of apoptosis in human colon cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2021;910:174466..
- 2) Nikodijević DD, Milutinović MG, Cvetković DM, Ćupurdija MĐ, Jovanović MM, Mrkić IV, Jankulović-Gavrović MĐ and Marković SD. Impact of bee venom and melittin on apoptosis and biotransformation in colorectal carcinoma cell lines. *Toxin Reviews.* 2019; doi: 10.1080/15569543.2019.1680564
- 3) Milutinović MG, Maksimović VM, Cvetković DM, Nikodijević DD, Stanković MS, Pešić M, Marković SD. Potential of *Teucrium chamaedrys* L. to modulate apoptosis and biotransformation in colorectal carcinoma cells. *J Ethnopharmacol.* 2019;240:111951.
- 4) Cvetković DM, Jovankić JV, Milutinović MG, Nikodijević DD, Grbović FJ, Ćirić AR, Topuzović MD, Marković SD. The Anti-Invasive Activity of *Robinia Pseudoacacia* L. and *Amorpha Fruticosa* L. on breast cancer MDA-MB-231 cell line. *Biologia.* 2019;74:915–928.
- 5) Milosevic B, Cvetkovic A, Ninkovic S, Markovic S, Mitrovic S, Stojanovic B, Radunovic A, Vulovic M and Cvetkovic D. Mammaglobin expression in tissue as a predictor of breast carcinoma aggressiveness. *Vojnosanit Pregl.* 2019; doi: 10.2298/VSP190129046M.

#### **4. Научна област дисертације**

Медицина. Изборно подручје: Онкологија.

#### **5. Научна област чланова комисије**

1. **Проф. др Иван Јовановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Имунологија и микробиологија и ванредни професор за ужу научну област Онкологија, председник
2. **Доц. др Немања Јовичић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Хистологија и ембриологија, члан
3. **Доц. др Весна Шкулетић**, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Беогаду, за ужу научну област Патологија, члан

## ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Душице Петровић Родић, комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др Душице Петровић Родић под називом: „Корелација локалне експресије тимидилат-синтазе и ендоглина са системским вредностима ендоглина и TGF- $\beta$  оболелих од колоректалног карцинома” и одобри њену израду.

## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **Проф. др Иван Јовановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Имунологија и микробиологија и ванредни професор за ужу научну област Онкологија, председник



2. **Доц. др Немања Јовичић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Хистологија и ембриологија, члан



3. **Доц. др Весна Шкулетић**, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Патологија, члан



У Крагујевцу, новембар 2021.

