

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

1. Одлука Наставно-Научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Наставно-Научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-4301/3-3 од 20.06.2012. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Душице Петровић под називом:

„КОРЕЛАЦИЈА ЛОКАЛНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ТИМИДИЛАТ-СИНТАЗЕ И ЕНДОГЛИНА (CD 105) И СИСТЕМСКИХ ВРЕДНОСТИ ЕНДОГЛИНА И TGF- β У БОЛЕСНИКА СА КОЛОРЕКТАЛНИМ КАРЦИНОМОМ“

Чланови Комисије су:

1. Проф. др Милан Кнежевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка анатомија, председник
2. Проф. др Снежана Јанчић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка анатомија, члан
3. Проф. др Драган Михаиловић, редовни професор Медицинског факултета у Нишу, за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

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

ИЗВЕШТАЈ

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

2.1. Биографија кандидата

А. Лични подаци

- Душица Петровић, рођена је у Крагујевцу, 29.01.1980 год.
- Основну и Средњу Медицинску школу “Сестре Нинковић” завршила је у Крагујевцу са одличним успехом
- Медицински факултет 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, првобитно у својству клиничког лекара, а 13. септембра 2010 год. од стране Министарства здравља Републике Србије одобрене су Специјалистичке студије из области **Патолошка анатомија** које је уписала октобра 2010 год. на Медицинском факултету у Крагујевцу
- Студент је Докторских Академских студија на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу од октобра 2008 год., изборно подручје Онкологија, а 9. јула 2010 год. положила Усмени докторантски испит са оценом 10 (десет)

Б. Подаци о објављеним радовима

Кандидат Душица Петровић је објавила:

- три рада у целини публикована у националном часопису
- већи број сажетака на домаћим научним скуповима.

Од поменутих радова за извештај су релевантни:

1. Јелена Лукић-Флора, **Душица Петровић**, Весна Станковић, Милош Милосављевић, Владимир Булатовић. Correlation of the HER2 protooncogene expression with the macroscopic manifestation and growth pattern of colorectal cancer. Acta Medica Medianae 2011; Vol.50(4): 5-10.
2. **Душица Петровић**, Весна Станковић, Милош Милосављевић, Владимир Булатовић. Correlation of p53 tumor suppressor gene expression with the macroscopic manifestation and growth pattern of colorectal cancer. Acta Medica Medianae 2011; Vol.50(3): 22-27.
3. **Душица Петровић**, Весна Станковић, Милош Милосављевић, Данијела Милошев, Стеван Матић. Корелација експресије HER2 са патолошким стадијумом колоректалних карцинома. Медицински часопис 2011; 45(1): 7-12.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „КОРЕЛАЦИЈА ЛОКАЛНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ТИМИДИЛАТ-СИНТАЗЕ И ЕНДОГЛИНА (CD 105) И СИСТЕМСКИХ ВРЕДНОСТИ ЕНДОГЛИНА И TGF- β У БОЛЕСНИКА СА КОЛОРЕКТАЛНИМ КАРЦИНОМОМ“

Предмет: У овој студији испитиваће се локална експресије ТС и ендоглина (CD 105) у ткиву пацијената са колоректалним карциномом (КРК), након хируршке ресекције дебелог црева, системске вредности ендоглина (CD 105) и TGF-а у пацијената са КРК 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:

- Степен локалне експресије ТС и ендоглина (CD 105), ниво системских вредности ендоглина (CD 105) и TGF-а је у корелацији са патохистолошким карактеристикама (хистолошки градус, нуклеарни градус, туморски лимфоцитни инфилтрат, дезмоплазија, некроза, лимфогена, васкуларна и перинуерална инвазија)
- Постоји корелација нивоа експресије и нивоа испитиваних биомаркера са патолошким стадијумом болести, старосном доби, полом, макроскопским изгледом и локализацијом
- Резултати ове студије могу послужити као дизајн за алгоритам прогностичких параметера и терапијских фактора.

2.3. Подобност кандидата

Кандидат Душица Петровић положила је усмени докторантски испит 9.07.2010. године са оценом 10 (десет). У току Докторских студија објавила је три рада у националним часописима, од чега два рада у којима је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Према најновијој Globocan бази података из 2008 (доступној на интернету од јуна 2010-те године) колоректални карцином се по инциденци обољевања налази на трећем месту код мушкараца (иза карцинома плућа и простате), а на другом месту код жена (иза карцинома дојке).

Све веће интересовање научне јавности усмерава се на испитивања клиничко-морфолошких параметара и појаве експресије појединих туморских маркера као значајних фактора у развоју онкогенезе. Велики значај се придаје биомаркерима на основу чијег се присуства или одсуства може предвидети одговор на постоперативну хемиотерапију.

Један од маркера хемиосензитивности је експресија ТС за коју се показало у досадашњим истраживањима да корелира са резистенцијом на 5-ФУ.

Колоректални карцином почиње на слузокожи одакле се директно шири кроз све слојеве црева, најчешће у околна ткива и органе. Метастатско ширење обезбеђује добро развијена мрежа лимфних путева и крвних судова, која почиње у субмукози. Брзина раста колоректалног карцинома варира, а једна студија је показала да време потребно за удвостручење туморске масе у просеку износи 620 дана.

У настанку метастаза учествује више међусобно повезаних фактора. Један од значајних фактора у развоју неоплазије је неоангиогенеза. Folkman је 1971 године први поставио хипотезу да је раст тумора завистан од туморске ангиогенезе. Wirchow и други немачки патолози су још пре једног века запазили да поједини хумани тумори поседују много крвних судова под претпоставком да доприносе расту и развоју малигних тумора и изнео претпоставку да би стратегија анти-ангиогенезе била ефикасна у лечењу карцинома. Ангиогенеза као сложен процес резултат је деловања стимулативних и инхибиторних фактора. Формирање нових крвних судова је од суштинског значаја за раст тумора, снабдевање кисеоником и хранљивим материјама, за елиминацију отпадних продуката метаболизма, паракрину стимулацију и пут ширења тумора.

Густина туморске микроциркулације (MVD, енг. “microvessel density”) говори о броју крвних и лимфних судова по јединици површине. MVD се може одредити употребом имунохистохемијских маркера који се вежу за различите компоненте ендотелних ћелија. Ендоглин (CD 105) је део рецепторског комплекса за TGF – В1 и 3 молекула који су бифункционални регулатори ћелијског раста и стимулишу пролиферацију мезенхималних, а инхибишу пролиферацију епителних ћелија, а настају у туморској ангиогенези.

2.5. Значај и циљ истраживања

Испитивање више од једног маркера, у овом случају ТС и ендоглина (CD 105), може послужити за боље разумевање туморске прогресије и одређивање прогнозе у појединачном случају.

Обзиром да у прегледаној литератури до сада нисмо пронашли податке о системским вредностима ендоглина (CD 105) и TGF-а пре- и постоперативно, очекујемо да ће ово истраживање указати на значајност у разликама њихових вредности.

Резултати овог истраживања би могли да укажу на потенцијални ризик за развој метастаза које су значајне у планирању лечења.

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.

Основни циљ ове студије је идентификација предиктивних и прогностичких параметара чиме се може избећи нефокусиран приступ у досадашњој примени постоперативне хемиотерапије и омогућити индивидуализација антитуморског третмана. У складу са основним циљем постављени су и посебни циљеви:

Циљ 1. Испитати присуство и ниво експресије ТС у туморском ткиву пацијената оболелих од КРК

Циљ 2. Испитати присуство и ниво експресије ендоглина (CD 105) у туморском ткиву пацијената оболелих од КРК

Циљ 3. Одредити ниво ендоглина (CD 105) у серуму пацијената оболелих од КРК, преоперативно и постоперативно

Циљ 4. Одредити ниво TGF-а у серуму пацијената оболелих од КРК, преоперативно и постоперативно

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

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

Ендоглин (CD 105) је део рецепторског комплекса за TGF – В1 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 (CD 105) 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, студијска популација и узорковање студијске популације

Врста студије

ПРОСПЕКТИВНА, КЛИНИЧКО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА СТУДИЈА

Материјал

У овој студији користиће се:

1) Постоперативни материјал добијен хируршком ресекцијом КРК од 128 пацијената, мушког и женског пола, са Хируршке Клинике, Клиничког Центра „Крагујевац“ у периоду од 1. јануара 2007. до 31. децембра 2009 год.

2) Преоперативни и постоперативни серум 20 пацијената оболелих од КРК, за период од 1.06.2012 до 1.08.2012 год.

Критеријум за укључивање у овом истраживању биће патохистолошки верификована дијагноза колоректалног карцинома епителног порекла (аденокарциноми).

Протокол за извођење клиничко-експерименталне студије одобрен од стране Етичког комитета Клиничког Центра „Крагујевац“ у Крагујевцу.

Методe

За болеснике са КРК који су примарно лечени хируршки биће испитивана имунохистохемијска експресија ТС, ендоглина (CD105) и преоперативно и постоперативно ће се одређивати ниво ендоглина (CD 105) и TGF-а 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 (CD 105) и TGF-а 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 КЦ „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 μ 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 ендогене пероксидазе, инкубирања препарата са примарним антисерумом и поступак извођења имунохистохемијске методе - LSAB+.

За детекцију ТС примениће се антитело ТС 106 и за ендоглин антитело CD 105 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.

Густина туморске микроциркулације (MVD, eng. „microvessel density“) показатељ је интензитета ангиогенезе и говори о броју крвних судова по јединици површине. MVD се може одредити употребом имунохистохемијских маркера који се вежу за различите компоненте ендотелних ћелија. За процену степена ангиогенезе у овој студији биће коришћена имунохистохемијска анализа са антителом 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 (1993 год.) 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) уз величину видног поља од 0,12 до 1 мм². У резултате ће се убрајати комплетни крвни судови и трачци 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 резултата добијених бројањем у 3 видна поља биће коначан резултат 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:

1) болесници са ниским степеном ангиогенезе (број крвних судова у туморском ткиву мањи од вредности медијане) и

2) болесници са високим степеном ангиогенезе (број крвних судова у туморском ткиву већи од вредности медијане).

Варијабле истраживања

Независне варијабле:

- Демографске карактеристике болесника- године живота, пол.
- Хистолошки тип тумора
- Локализација тумора
- Стадијум примарног тумора
- Местастазе 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 тимидилат синтазе (TC)
- Густина туморске микроциркулације (MVD)

- Системска вредност ендоглина (CD 105)
- Системска вредност TGF-а.

Снага студије

Студијски узорак 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.

Статистичка обрада података

За поређење средњих вредности променљиве двеју и више популација користиће се Man-Vitнијев и Kraskal-Valisov тест. Испитивање разлике између вредности пре и после помоћу Wilcoxon-овог теста. Испитивање зависности две описне променљиве испитиваће се помоћу Ni-kvadrat i Fišerovog теста. Испитивање утицаја више променљивих на бинарну променљиву помоћу мултиваријанте бинарне логистичке регресије.

Значење испитиваних варијабли (појединачно и у комбинацији) приказаће се након статистичке обраде добијених резултата код 128 пацијената помоћу комерцијалног пакета SPSS верзија 13.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Обзиром да је метастазирање вишестепени процес, сматра се да одређивање више од једног маркера, у овом случају ТС и ендоглина (CD 105) може послужити за боље разумевање прогресије тумора и да ће се кроз коекспресију поменутих маркера пружити могућност за дефинисање прогностичког алгорита чиме ће се унапредити индивидуализација антитуморског терапијског третмана у болесника са КРК.

Резултати овог истраживања би могли да укажу на потенцијални ризик за развој метастаза које су значајне у планирању лечења.

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 дисертације

Према најновијој Globocan бази података из 2008 (доступној на интернету од јуна 2010-те године) колоректални карцином се по инциденци обољевања налази на трећем месту код мушкараца (иза карцинома плућа и простате), а на другом месту код жена (иза карцинома дојке).

Предмет истраживања ове студије је утврђивање корелације клиничко - морфолошких параметара и нивоа локалне експресије тимидилат-синтазе (ТС) и ендоглина (CD 105), системских вредности ендоглина (CD 105) и TGF-а 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, серум крви 40 пацијената преоперативно и 20 пацијената преоперативно и постоперативно. Патохистолошки материјал ће бити имунохистохемијски анализиран ради утврђивања нивоа експресије ТС и ендоглина (CD 105), а ниво вредности ендоглина (CD 105) и TGF-а 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, Клиничког Центра „Крагујевац“.

Циљ ове студије је идентификација прогностичких параметара чиме се може избећи нефокусиран приступ у досадашњој примени постоперативне хемиотерапије и омогућити индивидуализација антитуморског третмана.

Обзиром да у прегледаној литератури до сада нисмо пронашли податке о системским вредностима ендоглина (CD 105) и TGF-а пре- и постоперативно, очекујемо да ће ово истраживање указати на значајност у разликама њихових вредности

До сада је извршена евалуација великог броја различитих маркера за КРК, али само мали број је препорука за клиничку праксу. Испитивање више од једног маркера, у овом случају ТС и ендоглина (CD 105), може послужити за боље разумевање туморске прогресије и одређивање прогнозе у појединачном случају.

2.10. Име ментора

За ментора ове докторске тезе предлаже се **Проф. др Милан Кнежевић**, редовни професор за ужу научну област Патолошка анатомија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Уже области онкологија и патологија

2.12. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Милан Кнежевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка анатомија, председник
2. Проф. др Снежана Јанчић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка анатомија, члан
3. Проф. др Драган Михаиловић, редовни професор Медицинског факултета у Нишу, за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

Закључак и предлог Комисије

1. На основу досадашњег научно истраживачког рада и публикованих радова кандидат Душица Петровић, испуњава све услове прописане Статутом Факултета медицинских наука и законом о Универзитету за одобрење теме и израду докторске дисертације;
2. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна;
3. Комисија сматра да ће докторска дисертација кандидата Душице Петровић указати да постоје значајни резултати у разликама вредности ендоглина (CD 105) и TGF- β , преоперативно и постоперативно у болесника са колоректалним карциномом и испитивањем више од једног маркера, у овом случају тимидилат-синтазе и ендоглина, може послужити за боље разумевање туморске прогресије, одређивање прогнозе у појединачном случају и као препорука за увођење у клиничку праксу.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Душице Петровић, под називом: „КОРЕЛАЦИЈА ЛОКАЛНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ТИМИДИЛАТ-СИНТАЗЕ И ЕНДОГЛИНА (CD 105) И СИСТЕМСКИХ ВРЕДНОСТИ ЕНДОГЛИНА И TGF- β У БОЛЕСНИКА СА КОЛОРЕКТАЛНИМ КАРЦИНОМОМ“ и одобри њену израду.

У Крагујевцу,

6.07.2012.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Проф. др Милан Кнежевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка анатомија, председник

2. Проф. др Снежана Јанчић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

3. Проф. др Драган Михаиловић, редовни професор Медицинског факултета у Нишу, за ужу научну област Патолошка анатомија, члан
