

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВАЦ**

1. Одлука Наставно-научног већа:

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-7479/3-6 од 10. 10. 2012. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **мр сци. мед. др Ивана Марић** под називом:

**„АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ PNL2, HMB-45 и Melan-a у ТУМОРСКИМ
ЋЕЛИЈАМА МЕЛАНОЦИТНЕ ГЕНЕЗЕ“**

На основу одлуке Научно-наставног већа формирана је Комисија у саставу:

- 1. Проф. др Маријан Новаковић**, редовни професор Војно-медицинске академије у Београду за ужу научну област Хирургија - председник,
- 2. Проф. др Снежана Јанчић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија - члан,
- 3. Проф. др Ирена Танасковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија-члан.

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

Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат мр сци. мед. др Ивана Марић испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета Медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата:

Др Ивана Марић је рођена 05. 12. 1977. године у Јагодини. Основну школу завршила је у Београду као носилац Вукове и Аласове дипломе, а Гимназију општег смера у Ћуприји. Медицински факултет у Крагујевцу уписала је 1996. године и завршила 15.07. 2003. године са просечном оценом 8,77. Након лекарског стажа одрађеног у Здравственом центру Ћуприја, стручни испит је положила 26.7. 2004. године. Своје интересовање за научно-истраживачки рад показала је током основног и гимназијског школовања, где је учествовала на разним такмичењима. Током студија на Медицинском факултету у Крагујевцу учествовала је више пута на студентским конгресима са интернационалним учешћем. Након завршених основних студија уписала је 2003. године Магистарске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу, изборно подручје Онкологија. Магистарску тезу под називом **„Евалуација дијагностичке сензитивности диференцијационих маркера у малигном меланому коже“** одбранила је 11.05.2007. године. са одличном оценом и тиме стекла академско звање Магистар медицинских наука. Од 2004-2012. године радила је на Медицинском факултету у Крагујевцу, прво као асистент-приправник, а потом и као асистент на предметима Патолошка анатомија и Хистологија и ембриологија, са 50% радног времена. Остатак радног времена обављала је у Здравственом центру Ћуприја на одељењу за Пластичну и реконструктивну хирургију, као и у Пријемно-тријажном центру. Том приликом је активно учествовала у хируршким захватима, и самостално обављала велики број истих. Учествовала је на више националних и интернационалних конгреса у току рада као лекар и асистент на Медицинском факултету у Крагујевцу. У периоду од 2005 до 2012. године сарађивала је са **проф. Јаном Несландом**, са **Radium Hospital Oslo, Одељење патологије, Осло, Норвешка**, на пројекту који је носио назив – **Melanoma research project**. Такође је у периоду од 2003-2005 године радила као секретар на интернационалном пројекту **“Ageing and care of elderly”**, који је био продукт сарадње **Sor-Trondelag University из Trondheim-а, Норвешка и Високе медицинске школе из Ћуприје**.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе:

Предложени **наслов** докторске тезе је **„Анализа експресије PNL2, HMB-45 и Melan-а у туморским ћелијама меланоцитне генезе“**. Комисија прихвата предложени наслов.

Предмет: Меланоцитне неоплазме су разнолика група лезија, која настаје пролиферацијом меланоцита, а од свих меланоцитних тумора највећи клинички значај имају меланоми. Типични случајеви меланома се релативно лако хистопатолошки препознају, али меланом је такође добро познат по варијабилним хистолошким сликама које често симулирају друге епителне или мезенхимне туморе. Због не тако ретко отежане хистопатолошке диференцијације чак и међу туморима меланоцитне генезе (некротизирајући меланом, десмопластични меланом, десмопластични епителоидни невус, хало невус, диспластични невус и др.), предмет нашег истраживања је компаративно испитивање дијагностичке сензитивности HMB-45, Melan-a A i PNL2 у невусима и меланомима.

Радне хипотезе: Полазећи од чињенице да се PNL2 у нашој земљи још увек не користи за дијагностику меланоцитних тумора и да прецизна микроморфолошка и имунохистохемијска дијагностика има важан терапијски и прогностички значај поставили смо задатак упоредног проучавања експресије HMB-45, Melan-a A i PNL2 у циљу изналажења дијагностички најсензитивнијег меланоцитног маркера, не би ли се смањио проценат лажно негативних и/или лажно позитивних дијагноза.

2.3. Подобност кандидата:

Кандидат мр сци мед. Иване Марић је као први аутор објавила један рад у целини у научном часопису националног значаја, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе:

Maric I, Bulatovic V, Cvetic M, Zindovic M. and Jancic S. "Brunner-oma": hamartoma or tumor? Medicus 2005; 6(2):92-3 (M52 - 1,5 бод)

Остали радови у часописима националног значаја (категорија M50)

1. **Maric I. and Petrovic D. Application of erythropoietin in treatment of anemia in patients on hemodialysis. Medicus 2003; 4(1):28-30 (M52 -1,5 бод)**
2. **Zindovic M, Maric I, Knezevic S and Jancic S. Peptide YY-cells (PYY) in neuroendocrine tumours of rectum. Medicus 2005; 6(2):24-6 (M52 -1,5 бод)**
3. **Cvetic M, Maric I, Knezevic S and Jancic S. Argirophyl "Carcinoid-like" breast cancer. Medicus 2005; 6(2):71-3 (M52 -1,5 бод)**
4. **Azanjac G, Radovanovic D, Maric I, Mitrovic S. Akralni amelanotichni melanom kao dijagnosticki problem. PONS Med J 2009;6(18);24-27 (није категорисан - 0 бодова)**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања:

Меланоцитни тумори коже обухватају широк спектар бенигних и малигних неоплазми од којих су најважнији меланоми, чија инциденца и морталитет последњих година драматично расту готово у свим крајевима света. Иако меланом обухвата само 4% свих дерматолошких карцинома, он је јако агресиван и непредвидив, и одговоран је за 80% смртност пацијената у корелацији са карциномом коже. Сваке године се открије око 160 000 нових случајева меланома, док је око 40 000 смртних случајева у свету узроковано овим карциномом. Етиологија меланома је непозната, али су, од бројних фактора ризика најзначајнији диспластични невуси. Они се сматрају предходником меланома, а прелаз из диспластичног невуса у рани меланом је доказан и клинички и хистолошки. То су најчешће сложени невуси са архитектурним и цитолошким елементима поремећеног раста и полиморфним хистолошким карактеристикама.

Типични случајеви меланома се релативно лако препознају под микроскопом због јункционалне активности, видљивог накупљања меланина, инвазије околног ткива, јаке цитолошке атипичности, инклузија у једру и бројних митоза које су често атипичне. Међутим, меланом је добро познат по варијабилним хистолошким сликама које су код њега врло честе јер се може презентовати епителоидним, вретенастим или једноставно бизарним ћелијама. Ове ћелије могу бити врло малих димензија (попут лимфоцита) или пак могу бити многоједарне, циновских размера. Цитоплазма меланоцита може бити базофилна, еозинофилна, пенушава, рабдоидна, онкоцитна, балонирана или да имитира "signet ring" ћелије. Меланин може бити обилан, оскудан или пак сасвим одсутан (амеланотични меланоми). Начин раста меланома може бити псеудогландуларан, псеудопапиларан, налик хемангиоперицитому, трабекуларан или верукозан. Понекад меланомске формације могу да сугеришу диференцијацију према Schwannovim или ганглијским ћелијама, а посебна варијанта је десмопластични меланом који је јако агресиван и који се често погрешно дијагностикује. Ћелије десмопластичног меланома су вретенасте, често присутне у малом броју и релативно слабо видљиве у јако десмопластичној строми. У прилог отежаној диференцијалној дијагнози десмопластичног меланома иде и чињеница да су његове ћелије обично негативне на НМВ-45 и Melan A, а позитивне на S-100. У рутинском раду се током хистопатолошке дијагностике меланома срећемо са два главна проблема. Прво - како препознати меланом ако нема меланина у ћелијама, а друго је питање малигнитета или бенигности меланоцитне промене. Не ретко се дешава да се бенигне меланоцитне промене као што су десмопластични епителоидни невус, хало невус или диспластични невус погрешно интерпретирају као меланоми. Са друге стране се површно ширећи меланоми могу заменити са бенигном лезијом.

На бази ових искустава су усвојене смернице за дијагнозу меланома које обухватају следеће критеријуме: нејасна ограниченост интрадермалне компоненте, латерално ширење појединих меланоцита, трансепидермална миграција, атипичност, митозе, мултифокалне некрозе, изражен дермални лимфоцитни инфилтрат. Типични меланоми имунореагују са S-100, НМВ-45 и Melanom A.

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одеђеној научној области:

Основни циљ ове студије је утврђивање експресије PNL2, HMB-45 и Melan-a у туморским ћелијама меланоцитне генезе. У том правцу ће се вршити испитивање бенигнух и малигнух тумора меланоцитне хистогенезе у односу на пол, старост, занимање пацијената и локализацију промене. Такође је обухваћена и хистопатолошка диференцијација бенигнух меланоцитних тумора, као и хистопатолошка диференцијација меланома у односу на дубину инвазије по Clark-у и на дебљину тумора по Breslow-у. У циљу истраживања биће укључено и имунохистохемијско испитивање експресије HMB-45, Melan-a A и PNL2 у невусима и меланомима. Од значаја истраживања са становишта актуелности су дијагностички капацитети моноклонског PNL2 антитела, који се последњих година интензивно испитују. Бројна експериментална истраживања су показала да PNL2 није само одличан маркер за нормалне меланоците и меланоме са неколико митотских деоба, већ препознаје и анапластични меланом који има велики број митотских деоба, па и комплетно некротизирани туморе. С тим у обзир, у студију је укључено и изналажење корелације експресије HMB-45, Melan-a A и PNL2 са биолошким понашњем и дубином инвазије тумора (за меланоме). У односу на локализацију промене испитиваће се корелација имуноензимске експресије HMB-45, Melan-a A и PNL2. Међусобни однос имуноензимске експресије HMB-45, Melan-a A и PNL2 ће такође бити предмет испитивања студије.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима:

У досадашњој литератури показано је да Типични меланоми имунореагују са S-100, HMB-45 и Melanom A. Позитивност на S-100 је значајна али није специфична јер се позитивна реакција виђа и у шваному, еозинофилном гранулому, глијалним туморима, неурофибромима итд. Добра страна овог маркера је то што реакција на S-100 није у директној корелацији са присуством меланина те је реакција позитивна и у амеланотичним меланомима. Овај маркер се није показао поуздан за идентификацију меланома у стадијуму I и II јер је повећање његовог нивоа у серуму већине пацијената забележено тек у III и IV стадијуму, практично када су већ присутне метастазе. HMB-45 је моноклонско антитело створено применом екстракта меланома. Раније се мислило да је његова експресија видљива само у меланомима, али се данас зна да је то маркер свих тумора који потичу од неуралне кресте, а позитиван је и у ангиомиолипомима. Меланоми показују јаку цитоплазматску реактивност на HMB-45 у 65-95% случајева. Позитивност је виђена скоро код свих типова меланома, али је важан изузетак десмопластични меланом. Јункционални невуси су позитивни на HMB-45, док су интрадермални невуси и дермалне компоненте сложених невуса негативне. У литератури се истиче да HMB-45 не потврђује сигурну разлику између бенигнух и малигнух меланоцитних пролиферација. Melan A / MART-1 је антиген који показује експресију у свим меланоцитима. Melan A је трансмембрански протеин који показује експресију у

кожи, ретини и у меланоцитним ћелијским линијама. Његова експресија је показана у великом броју меланома, а у неким студијама је процентуално већа диференцијација у односу на HMB-45 и на S-100 протеин MelanA показује експресију у 80-100% меланома. Код метастатских меланома имунореакција је полиморфна, док је код десмопластичног меланома реакција често негативна. Интрадермални, јункциони, плави невус, Spitz невус и сложени невуси су позитивни на Melan A. Позитивност на овај антиген показују и ћелије које продукују стероидне хормоне. Последњих година се интензивно испитују дијагностички капацитети моноклонског PNL2 антитела. PNL2 није, на основу много експерименталних истраживања само одличан маркер за нормалне меланоците и меланоме са неколико митотских деоба, већ служи за препознавање и анапластичног меланома, као и комплетно некротизираних тумора. Међутим, извештаји у литератури о коришћењу PNL2 у дијагностици меланома на хуманом материјалу су веома оскудни, при чему истичемо да у домоћај литератури нема података о коришћењу овог маркера у дијагностичке сврхе на нашим просторима. Због тога ово истраживање самим тим има и већи значај у нашој земљи, јер је и очекивање да се на основу експресије испитиваних антигена издвоји дијагностички најсензитивнији маркер, чиме би била унапређена и терапија меланома.

2.7. Методе истраживања:

За истраживање би користили оперативни материјал од 2005-2007 године, Клинике за пластичну и реконструктивну хирургију Клиничког центра Крагујевац, који је био фиксиран у 10% раствору формалдехида. У служби за Патологију КБЦ-Крагујевац оперативни материјал је рутински обрађиван у аутотехнику и калупњен у парафин. Ретроспективном анализом препарата добијених са парафинских блокова би микроморфолошким анализом формирали циљну групу која би обухватила меланоцитне туморе. Из меланоцитног спектра пролиферација би направили 2 експерименталне групе у којима би испитивали експресију HMB-45, Melan-a A и PNL2 :

1. група- 51 испитаник са невусима различите хистопатолошке диференцијације
2. група- 46 испитаника са меланомима класификованим по Clark-у и Breslow-у

МИКРОМОРФОЛОШКЕ МЕТОДЕ

Следеће микроморфолошке методе биће коришћене у испитивању студије:

1. Рутинска хематоксилин-еозин (H&E) метода за диференцијацију патохистолошких лезија
2. Хистохемијска VanGieson метода за испитивање колагене строге неопрелиферативних лезија
3. Имунохистохемијска ABC метода са HMB-45, Melan-a A i PNL2

За примиењена антитела позитивна ткивна контрола би била позитивна реакција у околном очуваном ткиву коже. За негативну контролу користили би се исечци ткива код којих би у току имунохистохемијског третмана уместо примарног антитела био коришћен TBS пуфер.

За одређивање вредности експресије HMB-45, Melan-a A i PNL2 користила би се метода „X skoga“, која се изражава процентуално на најмање 100, а најбоље 500, преко микрометарске мрежице, избројаних ћелија са следећим нивоима експресије: (-), (+), (++),(+++).

Вредност експресије испитиваних маркера би претстављала проценат имунореактивних ћелија. Затим би била одређена медијана и испитаници би такође били подељени у две групе: они са ниским степеном експресије (процент мањи или једнак вредности медијане) и они са високим степеном експресије маркера (процент већи од вредности медијане).

Вршиће се испитивање експресије PNL2 маркера у односу на HMB-45, чија експресија представља златни стандард дијагностике. Сваки маркер има своју специфичну контролу која се препоручује. Контролу ће, у нашем случају, чинити пресеци меланома који су вишеструко тестирани у лабораторији одељења Експерименталне патологије, Radiumhospitalet и Rikshospitalet, у Ослу, Норвешка (са љубазношћу проф. Јана М.Несланда на уступљеним блоковима), и који су позитивни на PNL2.

Снага студије: Прорачун величине узорка је заснован на резултатима неколико претходних истраживања који су испитивали дијагностичке перформанске појединих имунохистохемијских маркера (Ohsie et al., 2008). У њима је показано је да сензитивност HMB45 варира од 69–93% а MART-1/ Melan-A од 75–92%, у зависности од методолошких приступа и типа неоплазије. На основу формуле $95\% \text{ CI} = \pm 1,96 * \sqrt{(pq/n)}$, где је р-пропорција маркер-позитивних у групи оболелих, q-пропорција маркер-негативних у групи оболелих, а n-величина узорка, за претпоставку 95% варирања интервала граница

поверења од 10%, како је коришћено у ранијим сличним истраживањима типа дијагностичких студија (Guyat et al., 2006), прорачунато је неколико студијских узорака, у неколико сценарија, имајући у виду максималне, минималне и средње вредности сензитивности два маркера. На овај начин прорачунат је број од 52 испитаника (средња вредност 25, 28, 72 и 82) и 57 (на основу средње вредности специфичности од 82%). Сходно томе, укупни студијски узорак је утврђен на 60 оболелих испитаника.

За процену дијагностичких перформанси сваког од три предвиђена маркера (PNL 2, HMB-45, Melan A) користиће се прорачун ROC криве, као и стандардна палета параметара: специфичност, сензитивност, предиктивне вредности и количник вероватноће (енгл. „likelihood ratio“).

Врста студије: Клиничко-експериментална

Статистичка обрада података: Сви добијени подаци ће бити табеларно приказани и припремљени за статистичку обраду. Урадиће се статистичка анализа средњих вредности параметарским тестовима (Student-ov t -тест, Kruskal-Wallis-ov тест). Уколико се добију мале вредности примениће се непараметријски тестови (χ^2 и Fisher-ов тест стварне вероватноће). За потврду ће се урадити двосмерна анализа варијансе рангова (Friedman-ов тест). За све анализе ће бити корошћен софтверски пакет SPSS верзија 16. Добијени резултати ће бити приказани табеларно и графички.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекујемо да ће резултати експресије HMB-45, Melan-a A и PNL2 и њихове корелације са клиничко-патолошким статусом испитаника помоћи да се квантитативном анализом експресије испитиваних антигена издвоји дијагностички најсензитивнији маркер за туморе меланоцитне хистогенезе. Такође очекујемо да се ефикасније хистопатолошки решавају десмопластични меланоми и некротизирајући меланоми, као и да се смањи број лажно позитивних и/или лажно негативних дијагноза, нарочито када су у питању меланоми. Јако је битно да се, због прецизне и правовремене хистопатолошке дијагнозе, унапреди и терапијски приступ за ове неоплазме.

2.9. Оквирни садржај дисертације

У овој студији се по први пут на нашим просторима врши компаративно испитивање дијагностичке сензитивности HMB-45, Melan-a A и PNL2 у невусима и меланомима. Већ је наведено да се дијагностички капацитети моноклонског PNL2 антитела интензивно истражују уназад пар година. Бројна експериментална

истраживања су показала да PNL2 није само одличан маркер за нормалне меланоците и меланоме са неколико митотских деоба, већ препознаје и анапластични меланом који има велики број митотских деоба, па и комплетно некротизирани туморе. Наше очекивање је да се, на основу експресије испитиваних антигена, издвоји дијагностички најсензитивнији маркер, што би омогућило ефикаснију и прецизнију хистопатолошку дијагностику за туморе меланоцитне хистогенезе, чиме би била унапређена и терапија меланома.

Обзиром да ћелије меланома различито реагују на одређена антитела, наш циљ је да испитамо међусобни однос имуноензимске експресије HMB-45, Melan-a A i PNL2, корелацију имуноензимске експресије HMB-45, Melan-a A i PNL2 у односу на локализацију промене, као и изналажење корелације експресије наведених антитела са биолошким понашањем и дубином инвазије тумора. Утврђивање дијагностички најсензитивнијег меланоцитног маркера је од велике важности и може у великом проценту смањити број лажно негативних и/или лажно позитивних дијагноза.

2.10. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже **проф. др Снежану Јанчић**, редовног професора за ужу научну област Патолошка анатомија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Проф. др Снежана Јанчић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и планираном методологијом.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Онкологија

2.12. Научна област чланова комисије

- 1. Проф. др Маријан Новаковић**, председник, редовни професор Војно-медицинске академије у Београду за ужу научну област Хирургија
- 2. Проф. др Снежана Јанчић**, члан, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија
- 3. Проф. др Ирена Танасковић**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

1. На основу досадашњег научног рада и публикованих радова мр сци. мед. др Ивана Марић испуњава све услове прописане Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и Законом о високом образовању за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен, а научна методологија јасна и прецизна.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза бити од великог научног и практичног значаја у циљу изналажења дијагностички најсензитивнијег меланоцитног маркера, не би ли се смањио проценат лажно негативних и/или лажно позитивних дијагноза када је реч о малигном меланому.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **мр сци. мед. Иване Марић** под називом „ **Анализа експресије PNL2, HMB-45 и Melan-a у туморским ћелијама меланоцитне генезе** “ и одобри њену израду.

У Београду

04.04.2013. године.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Проф. др Маријан Новаковић, редовни професор Војно-медицинске академије у Београду за ужу научну област Хирургија – председник

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

Проф. др Ирена Танасковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија-члан
