

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**  
**КРАГУЈЕВАЦ**

**1. Одлука Изборног већа**

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-4816/3-4 од 11.07.2012. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидаткиње Иване Туфегџић, под називом: „**Корелација експресије CD31 и глаткомишићног актина са морфолошким карактеристикама аденокарцинома ректума**”

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Снежана Јанчић**, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Патолошка анатомија, председник
2. **Проф. др Небојша Здравковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Медицинска статистика и информатика, члан
3. **Проф. др Љубинка Јанковић-Величковић**, ванредни професор Медицинског факултета, Универзитета у Нишу, ужа научна област Патолошка анатомија, члан
4. **Доц. др Весна Станковић**, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Патолошка анатомија, члан
5. **Доц. др Драгче Радовановић**, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Хирургија, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу следећи

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

Кандидаткиња, др Ивана Туфегџић, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Медицинског факултета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

**2.1 Кратка биографија кандидата**

Др Ивана Туфегџић је рођена 1972 године у Београду. Медицински факултет је уписала такође у Београду и исти завршила 1999 године, са просечном оценом 8,88. Специјализацију из Патологије је завршила у **Институту** за патологију и судску медицину Војномедицинске академије у Београду 2004 године, са одличним успехом, где и сада ради на месту специјалисте патолога са ужим областима интересовања из патологије дигестивног система и патологије јетре. Стални је

члан Онколошког конзилијума за болести дигестивног система, као и Трансплационог тима за трансплантацију јетре ВМА. Године 2008 је била на едукацији из области патологије трансплантације јетре у *Institute of Liver Studies, King's College Hospital* у Лондону, Велика Британија. Студент је Докторских академских студија на Медицинском факултету у Крагујевцу, смер Онкологија, где је 2009 године положила усмени докторски испит. Активно се служи енглеским језиком.

## 2.2 Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

**Наслов:** "Корелација експресије CD31 и глаткомишићног актина са морфолошким карактеристикама аденокарцинома ректума"

**Предмет:** Ова студија ће се бавити испитивањем перитуморалне строме у аденокарциному ректума са посебним освртом на количину дезмоплазије, миофибробласте и васкуларне просторе.

**Хипотезе:**

Предложено истраживање аденокарцинома ректума са морфолошким карактеристикама у које спадају: хистолошки градус, стадијум, присутност лимфатичке, венске и перинеуралне инвазије, начин раста тумора, као и присутност метастаза у лимфним нодусима и јетри, има неколико хипотеза:

- Тумори са различитим морфолошким карактеристикама (горе наведеним) имају различиту количину дезмоплазије и различиту количину миофибробласта;
- Тумори са различитим морфолошким карактеристикама имају различите карактеристике васкуларних простора у различитим деловима тумора, у које спадају: (а) густина васкуларних простора, (б) обим васкуларних простора, (ц) површина васкуларних простора („*endothelial area*“, *EA*);
- Постоје различите вредности просека сваког испитиваног параметра строме који могу указати на присуство метастазе у лимфним нодусима и/или јетри.

## 2.3 Подобност кандидата

Кандидаткиња је објавила један рад у целини у часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе:

1. Tufegdžić I, Radovanović Z, Jović J, Jančić S. Quantitative evaluation of stromal myofibroblasts and their significance for metastatic capacity of colorectal carcinoma, *Journal of BUON*. 2012; 17: 85-91 **M23 – 3 бода**

## 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Аденокарцином ректума је један од најчешћих малигних болести људи, са честим развојем метастаза, најчешће у јетри. Обзиром да стадијум болести највише утиче на терапијски приступ и исход болести, неопходна су истраживања у циљу бољег разумевања склоности тумора ка инвазији и метастазама. Туморска инвазија обухвата комплексну реакцију туморских ћелија и строме тумора, при чему се сматра да је за стварање дезмопластичне строме најпре одговорна активација

миофибробласта, док је ангиогенеза есенцијална за метастатски потенцијал тумора. Различите и малобројне студије које су користиле „*image*“ анализу су често дале контрадикторне резултате у вези међусобног утицаја туморских ћелија и околних параметара строме и сколоности тумора ка инвазији и метастазама. Овакви резултати су навели аутора да користећи „*image*“ анализу покуша да што прецизније измери вредности саставних делова строме и утврди њихову повезаност са морфолошким карактеристикама тумора.

## **2.5 Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области**

Циљеви:

Предложено истраживање има неколико циљева:

- Хистохемијско и квантитативно испитивање перитуморалне дезмопластичне реакције користећи компјутеризовану „*image*“ анализу.
- Имунохистохемијско и квантитативно испитивање миофибробласта, густине, обима и вредности ендотелијалне површине („*endothelial area*“, *EA*) васкуларних простора васкулатуре строме у различитим деловима перитуморалне строме користећи компјутеризовану „*image*“ анализу.
- Испитивање корелације количине дезмоплазије и миофибробласта у односу на хистолошки градус тумора, стадијум тумора, присутност лимфатичке и венске инвазије, присутност перинеуралне инвазије, начина раста тумора, као и присуство метастаза у лимфним нодусима и јетри.
- Испитивање корелације густине, обима и вредности ендотелијалне површине васкуларних простора у односу на хистолошки градус тумора, стадијум тумора, присутност лимфатичке и венске инвазије, присутност перинеуралне инвазије, начин раста тумора, као и присуство метастаза у лимфним нодусима и јетри.
- Утврђивање просечних вредности испитиваних параметара строме које могу указати на присуство метастаза.

Значај:

Истраживање ће допринети прецизнијем сагледавању саставних делова туморске строме, као и утврђивању њихове повезаности са морфолошким карактеристикама аденокарцинома ректума.

Практична примена резултата се односи на свакодневни рад при микроскопирању узорака тумора добијених ендоскопском биопсијом, чијим анализирањем параметара туморске строме, уз корићење „*image*“ анализе, би се могло утврдити постоји ли склоност тумора ка инвазији и метастазирању, што има значајне импликације на примену оптималне терапије.

## **2.6 Веза са досадашњим истраживањима**

Као и код свих карцинома, тако и код аденокарцинома ректума, од стадијума болести зависи терапијски приступ и исход болести, па се спроводе опсежна истраживања о склоности тумора ка инвазији и метастазама. Туморска инвазија обухвата комплексну реакцију туморских ћелија и строме тумора, која варира од

оскудне до строме скирозних карактеристика, уз различит степен ангиогенезе. Сматра се да је за стварање дезмопластичне строме одговорна активација фибробласта, познатијих као миофибробласти који продукују екстрацелуларни матрикс. У литератури се истичу бројни су подаци о утицају миофибробласта на прогресију тумора. Нека истраживања карцинома плућа, дојке, усне шупљине и коже су указала на повезаност између миофибробласта и склоности тумора ка инвазији и метастазама, као и са рецидивом тумора, док друге студије су указале да миофибробласти имају протективну улогу против туморских ћелија. У аденокарциному колона неколико студија које су користиле „*image*“ анализу су показале да је количина миофибробласта у корелацији са инвазивним капацитетом тумора, као и да је користан индикатор за појаву рецидива. Ангиогенеза је веома рани феномен у аденокарциному колона и есенцијална је за метастатски потенцијал тумора. У различитим студијама квалитативне и квантитативне карактеристике ангиогенезе су делимично проучаване. У неким студијама резултати су показали да је густина васкуларних простора тумора у асоцијацији са преживљавањем пацијената, друга истраживања која су користила „*image*“ анализу су показала да је обим васкулатуре на инвазивном фронту тумора у корелацији са метастатским потенцијалом тумора, док између вредности ендотелијалне површине мерене „*image*“ анализом и густине васкуларних простора бројених конвенционалним методом нема повезаности. Ови резултати су усмерили кандидата да користећи „*image*“ анализу покуша да што прецизније измери вредности параметара строме и надовезујући се на публиковане резултате других аутора у извесној мери разјасни патогенезу дезмоплазије, као и да покуша да нађемо везу између особина строме и биолошког понашања тумора.

## 2.7 Методе истраживања

### *Врста студије:*

Ради се о клиничко-експерименталној студији у којој ће се утврђивати напред наведени параметри туморске строме који се могу повезати са стадијумом, присуством метастаза и начином раста тумора.

### *Методологија:*

Истраживањем ће бити било обухваћено 70 пацијената који су оперисани због аденокарцинома ректума у периоду од 2008 до 2011 године на Војномедицинској академији од којих су 23 женског, а 47 мушког рода, добне старости од 21 до 86 година. Код 37 пацијената су постојале метастазе у лимфним нодусима, док су код 7 пацијената постојале метастазе у јетри.

У истраживању ће се користити 70 готових парафинских калупа ресектата ректума наведених пацијената који су обрађени у **Институту** за патологију и судску медицину Војномедицинске академије. Парафински калупи ће бити сечени на аутоматском ротационом микротому *LKB Historange* на резове дебљине 4μ. На резовима ће се применити рутинска хематоксилин-еозин метода (*H&E*), а остали резови ће се пренети на *Superfrost+* предметна стакла. За визуелизацију перитуморалне дезмоплазије ће се користити специјално хистохемијско бојење по методи *Van Gieson*. За визуелизацију миофибробласта ће се користити специјално имунохистохемијско бојење глаткомишићни актин (*Smooth Muscle Actin- SMA*), а за визуелизацију ендотелних ћелија које облажу лумен васкуларних

простора имунохистохемијско бојење са CD31 антителом. Демаскирање епитопа за глаткомишићни актин, SMA ће се радити у 0.05М цитратном пуферу рН 6.0 у микроталасној пећници, а за CD 31 у раствору за демаскирање епитопа рН 9.0 такође у микроталасној пећници. Као примарна антитела ће се користити моноклонска мишја антитела *anti SMA* у разблажењу 1:50 и анти CD31 у разблажењу 1:10. Користиће се систем за визуелизацију EnVision и хромоген DAB. Као позитивни контролни узорци за тестирање наведеног маркера користиће се SMA и CD31 који су раније вишеструко тестирани и сигурно садрже испитивани антиген. Као негативна контрола за имунохистохемијско бојење користиће се узорци ткива третираны неимуном серумом уместо примарног антитела. Сваки HE препарат ће се микроскопски прегледати, уз одређивање уобичајених карактеристика аденокарцинома који чине део рутинског патохистолошког извештаја: хистолошки градус тумора (HG), стадијум тумора, присутност лимфатичке и венске инвазије, присутност перинеуралне инвазије, као и присуство метастаза у лимфним нодусима и јетри. Хистолошки градус се одређује на основу *WHO* критеријума, а стадијум болести на основу *AJCC/UICC TNM*, као и стадијум тумора на основу модификованог Astler Collier stagig система. Под контролом два независна експерта ће се конвенцијалном семикавантитативном методом за сваки препарат утврдио степен дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата као: оскудан, умерен или обилан. Такође, одредиће се и начин раста тумора, као експанзивни или инфилтративни. Препарати ће се затим фотографисати на дигиталном микроскопу под увећањем x5 за дезмоплазију, x10 за вакулатуру и x20 за миофибробласте. Са сваког препарата обојеног SMA и Van Giseon методом ће се урадити по девет снимака из различитих делова тумора. Са препарата бојених на CD31 ће се начинити по девет снимака по следећој шеми: три слике са инвазивног фронта тумора (под инвазивним фронтом тумора подразумева се место инфилтрације које је обухваћено 50% туморским ткивом, 50% околним ткивом у којем постоји инвазија), три слике из зона „hot spots“ ( места где је густина васкулатуре у тумору највећа, након што се на увећању од 4x евидентира место највеће васкуларизације у тумору) и три слике из тумора изабране методом случајног избора (при чему је у овим пољима туморско ткиво 100% присутно). Избегаваће се подручја некрозе и улцерације тумора. Компјутерска анализа фотографија ће се учинити коришћењем бесплатног научног софтверског програма „ImageJ“, доступног на интернет адреси: <http://rsb.info.nih.gov/ij>. Програм омогућава визуелизацију испитиваног параметра строге у црвеној боји и мануелну селекцију и даљу анализу истог од стране патолога. Прегледана површина једне фотографије је аналогна 1280  $\mu\text{m}$  x 960  $\mu\text{m}$  (1,2 $\text{mm}^2$ ). За анализу параметара дезмоплазије, миофибробласта, као и ендотелијалне арее (ендотелијална ареа представља проценат површине CD31 позитивних ендотелних ћелија) систем селектоване зоне, аутоматски пребацује у проценат испитиваног поља (% area). Средње вредности процента сасваког препарата се узму у рад за даљу анализу. Систем омогућава и одређивање густине васкуларних простора изражене бројем CD31 позитивних васкуларних простора по 1 $\text{mm}^2$ , као и обима васкуларних простора изражен у мм. Добијене вредности процента дезмоплазије, миофибробласта, густине, обима и површине васкулатуре би се упоредиле са свим напред описаним морфолошким карактеристикама аденокарцинома ректума.

## 2.8 Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да истраживање допринесе:

- бољем сагледавању карактеристика саставних делова строме аденокарцинома ректума
- прецизним мерењем количине дезмоплазије, миофибробласта, густине, обима и површине васкуларних простора коришћењем „*image*“ анализе би се омогућило боље сагледавање односа строме и морфолошких карактеристика туморских ћелија
- бољем разумевању склоности ка инвазији и метастатског потенцијала тумора на основу карактеристика строме аденокарцинома ректума

## 2.9. Оквирни садржај дисертације

Аденокарцином ректума је једно од најчешћих малигних болести људи, са све учесталијим појављивањем болести у млађој животној доби, као и са великом склоношћу тумора ка метастазирању у лимфне нодусе и ткиво јетре. Туморска инвазија представља комплексну реакцију строме тумора и туморских ћелија, при чему количина строме варира, уз присуство различитог степена ангиогенезе. Сматра се да је за стварање дезмопластичне строме одговорна активација миофибробласта, у више студија је показана повезаност миофибробласта и склоности ка инвазији и метастазама, док је коришћењем „*image*“ анализе показано да су миофибробласти и користан индикатор појаве рецидива. Обзиром да је ангиогенеза есенцијална за метастатски потенцијал тумора, различита истраживања која су користила „*image*“ анализу су дала опречне резултате односа густине, обима, као и ендотелијалне површине васкуларних простора и склоности тумора ка инвазији. У нашој клиничко-експерименталној студији ће бити коришћено 70 готових парафинских калупа ресектата, оперисаних због аденокарцинома ректума, са различитим морфолошким карактеристикама у које спадају: хистолошки градус, стадијум, присутност лимфатичке, венске и перинеуралне инвазије, начин раста тумора, као и присутност метастаза у лимфним нодусима и јетри. Циљ нашег истраживања је да се коришћењем „*image*“ анализе измери вредност саставних делова строме, са претходним посебним освртом на имунохистохемијско испитивање миофибробласта, густине, обима и вредности ендотелијалне површине („*endothelial area*“, *EA*) васкуларних простора васкулатуре строме и хистохемијско испитивање перитуморалне дезмопластичне реакције, као и да се што прецизније дефинишу карактеристике саставних делова строме и њихов однос са напред наведеним морфолошким карактеристикама.

## 2.10. Име ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже се Проф. др Снежана Јанчић редовни професор на предмету Патолошка анатомија, Факултета медицинских наука, универзитета у Крагујевцу.

### **2.11 Научна област дисертације**

Медицина. Изборно подручје: Онкологија

### **2.12 Научна област чланова комисије**

1. **Проф. др Снежана Јанчић**, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Патолошка анатомија, председник
2. **Проф. др Небојша Здравковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Медицинска статистика и информатика, члан
3. **Проф. др Љубинка Јанковић-Величковић**, ванредни професор Медицинског факултета, Универзитета у Нишу, ужа научна област Патолошка анатомија, члан
4. **Доц. др Весна Станковић**, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Патолошка анатомија, члан
5. **Доц. др Драгче Радовановић**, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Хирургија, члан

## **ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ**

1. На основу досадашег научног рада и публикованих радова др Ивана Туфегџић испуњава све услове прописане Статутом Медицинског факултета, Статутом Универзитета у Крагујевцу и Законом о високом образовању за одобрење теме и израду докторске дисертације;
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.
3. Ради се о оригиналном научном делу где се испитује утицај перитуморалне строме на инвазију и метастазитање аденокарцинома ректума, те комисија сматра да ће предложена докторска теза бити од особитог научног и практичног значаја,
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидаткиње др Иване Туфегџић под називом „**Корелација експресије CD31 и глаткомишићног актина са морфолошким карактеристикама аденокарцинома ректума**” и одобри њену израду.

## **ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ**

1. \_\_\_\_\_  
**Проф.др Снежана Јанчић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Патолошка анатомија, председник
2. \_\_\_\_\_  
**Проф.др Небојша Здравковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Медицинска статистика и информатика, члан
3. \_\_\_\_\_  
**Проф.др Љубинка Јанковић-Величковић**, ванредни професор Медицинског факултета, Универзитета у Нишу, ужа научна област Патолошка анатомија, члан
4. \_\_\_\_\_  
**Доц. др Весна Станковић**, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Патолошка анатомија, члан
5. \_\_\_\_\_  
**Доц.др Драгче Радовановић**, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Хирургија, члан

У Крагујевцу, 03.09.2012. год.