

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу број IV-3-720/40 од 13.07.2016 године формирана је Комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Јелене Лукић Флора под називом:

„УТИЦАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ РЕЦЕПТОРА ЗА ЛЕПТИН НА НЕОАНГИОГЕНЕЗУ И РЕГУЛАЦИЈУ ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА ЕНДОМЕТРОИДНОГ АДЕНОКАРЦИНОМА“

Чланови комисије су:

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

2. Доц др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

3. Доц. др Миљан Крстић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Патологија, члан

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

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат др Јелена Лукић Флора 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 Јелена Лукић Флора је рођена 20. 06. 1978. у Пожаревцу. Основну школу и Гимназију је завршила у Великом Градишту. Др Лукић Флора је Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу завршила школске 2005/2006. године. На истом факултету је 2006/2007 школске године уписала Докторске академске студије ИП Онкологија и 2010 год. је успешно положила усмени докторски испит.

Као доктор медицине др Лукић Флора од 01.02.2008. године почиње да ради у Дому здравља у Великом Градишту, а од 11.01.2011. је запошљена као лекар на специјализацији Гинекологије и акушерства у Општој болници Панчево, где се и данас налази.

Учествовала је на бројним домаћим и међународним научним и стручним скуповима. Говори енглески језик и поседује знање из различитих области рада на персоналним рачунарима. Удата је, има сина Николу и ћерку Елену.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске дисертације

Наслов: Утицај експресије рецептора за лептин на неоангиогенезу и регулацију ћелијског циклуса ендометриоидног аденокарцинома.

Предмет: Испитивање утицаја експресије рецептора за лептин на синтезу VEGF неоангиогенезу, пролиферацију и на експресију молекула који учествују у контроли ћелијског циклуса ендометриоидног аденокарцинома материце.

Хипотезе:

- Повишена експресија рецептора за лептин је у позитивној корелацији са повишеном експресијом Суclin Е и индексом пролиферације у ендометриоидном аденокарциному.
- Експресија рецептора за лептин стимулише секрецију VEGF, кључног молекула за формирање васкуларне мреже и преко њега стимулише неоангиогенезу.
- Повишена експресија рецептора за лептин је у позитивној корелацији са метастатским потенцијалом и агресивним фенотипом ендометриоидног аденокарцинома.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат има објављен рад у целини, на енглеском језику, у часопису са SSCI листе, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Jelena Lukić-Flora, Dušica Petrović, Vesna Stanković, Miloš Milosavljević and Vladimir Bulatović: Correlation of HER2 proto-oncogene expression with the macroscopic manifestation and growth pattern of colorectal cancer. Acta Medica Medianae 2011; 50(4):5-10 (M52 = 1,5бод)

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Карцином ендометријума је један од најчешћих малигних тумора женских гениталних органа, Јавља се претежно код постменопаузалних жена и често је удружен са гојазношћу, нулипаритетом, ановулацијом, дијабетесом и хипертензијом. У пацијенткиња са карциномом ендометријума су запажени високи нивои лептина који је продукт гена гојазности (Ob-gena).

Лептин је мултифункционални пептидни хормон са различитим биолошким функцијама које обухватају регулацију апетита, повећање продукције топлоте, учешће у репродуктивним функцијама, ангиогенези и др, а последњу деценију се истиче његова улога и у пролиферацији, инвазији и метастазирању тумора. Раст и прогресија тумора су условљени пролиферацијом ћелија. Постоје запажања о про-ангиогеним и пролиферативним својствима лептина, као и саопштења о појачаној експресији LEPR у тумора са агресивним биолошким потенцијалом.

Лептин делује преко својих трансмембранских рецептора (LEPR/ Ob-R), чија је експресија потврђена у многим бенигним и малигним туморима, укључујући и ендометроидни аденокарцином.

Због свега наведеног испитивање утицаја експресије рецептора за лептин на регулацију ћелијског циклуса, неоангиогенезу и пролиферацију ћелија у ендометроидном аденокарциному има велики значај.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије:

1. Доказивањем повишеног нивоа експресије LEPR, Cyclin E, VEGF, изражене неоангиогенезе и пролиферације је могуће издвојити пацијенткиње са високим ризиком за прогресију малигне болести, што је од значаја за постоперативни третман нарочито болесница са T1 стадијумом ендометроидног аденокарцинома.

2. Истраживање ће омогућити идентификацију потенцијалног прогностичког маркера, што пружа могућност индивидуализације антитуморског третмана.

Циљ студије:

Основни циљ овог истраживања је да се испита утицај експресије лептин рецептора на туморску ангиогенезу, пролиферацију и експресију Cyclin-a E у ендометријалном аденокарциному. У складу са овим основним циљем, постављени су следећи задаци:

1. Испитивање дистрибуције ендометријалних карцинома у односу на демографске карактеристике пацијенткиња (*старост и пол*)
2. Анализа ендометријалних аденокарцинома у односу на стадијум тумора (*величина примарног тумора, локална туморска инвазија, метастазе у регионалним лимфним жлездама и удаљене метастазе*) и у односу на хистопатолошки статус (*хистолошки и нуклеарни гадус, инвазија лимфатика, ангиоинвазија, перинеурална инвазија, инвазија миометријума и некроза*)
3. Имунохистохемијско испитивање експресије рецептора за лептин (LEPR) у туморском ткиву
4. Имунохистохемијско испитивање експресије VEGF, CD105, Ki67 и Cyclin-a E у туморском ткиву и корелација ових вредности са експресијом LEPR
5. Корелација експресије LEPR, VEGF, CD105, Ki67 и Cyclin-a E, са клиничко-патолошким и прогностичким параметрима.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Petridou и сар су показали да постоји јака позитивна асоцијација између нивоа серумског лептина и ендометријалног карцинома, а у прилог тога говоре и извештаји о експресији лептин рецептора у туморским ћелијама карцинома ендометријума.

Извештај Gezginс-a и сар. (J Obstet Gynaecol. 2013;33(5):508-11) указује на значајно већу експресију Cyclin-a E у ендометријалном аденокарциному у поређењу са хиперпластичним и нормално пролиферишућим ендометријумом. Недавно је показано да је експресија Cyclin-a E у ендометријалном карциному у корелацији са преживљавањем, па се овај маркер сматра добрим индикатором прогнозе карцинома ендометријума.

У литератури нема података о утицају експресије рецептора за лептин на експресију Cyclin E у ендометријалном аденокарциному, а испитивање корелације између ова два маркера је један од задатака ве студије. чиме би се одговорило на питање да ли можда лептин, преко Cyclin-a E, учествује у регулацији ћелијског циклуса.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

У циљу нашег истраживања спровели би смо, делом проспективну, делом ретроспективну, опсервациону студију типа серије случаја хируршки лечених пацијенткиња. Ретроспективна анализа би обухватила све социодемографске, клиничке и патохистолошке налазе, док би проспективно била урађена имунохистохемијска анализа и евалуирани нивои експресије испитиваних туморских маркера из туморског ткива добијеног након операције тумора

2.7.2. Популација која се истражује

Истраживањем би биле обухваћене пацијенткиње којима је урађена хистеректомија због карцинома ендометријума и болеснице са ендометријалном хиперплазијом. Из групе оболелих од ендометроидног карцинома најмлађа болесница је у време опрације имала 42 године, док је најстарија имала 81 годину. Најмлађа болесница са ендометријалном хиперплазијом у време узимања експлоративне биопсије имала 35 год, док је настарија болесница из ове групе имала 78 годину. Све испитанице су са територије шумадијског округа.

2.7.3. Узорковање

Узорковање би се урадило случајним избором пацијенткиња лечених на ГАК КЦ Крагујевац у периоду од јануара 2006. до децембра 2008. год. У овом истраживању би се користио биопсијски, оперативни материјал добијен хистеректомијом и биопсијски материјал добијен експлоративном киретажом. Целокупан материјал је укалупљен у парафинске блокове и архивиран у Центру за патологију КЦ Крагујевац. На основу стандардних патохистолошких извештаја, из тог периода, би била формирана експеримантална група коју чине оперативне биопсије ендометроидног аденокарцинома (n=36). Прву контролну групу (n=36), у овој студији, би чинили биопсијски узорци са ендометријалном хиперплазијом добијени експлоративном киретажом. Другу контролну групу (n=36) у овој студији, би чиниле оперативне биопсије не-туморског ткива ендометријума (из околине тумора) које се према протоколу узимају из оперативног препарата достављеног Служби за патологију.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле у овој студији су:

- демографске карактеристике пацијената (старост и пол) ,
- локализација тумора,
- стадијум примарног тумора,
- макроскопски изглед тумора,

- метастазе у регионалним лимфним жлездама,
- метастазе у удаљеним органима
- хистолошки градус тумора,
- нуклеарни градус тумора,
- инвазија миометријума
- васкуларна инвазија, инвазија лимфатика и перинеурална инвазија и
- некроза.

Зависне варијабле су:

- експресија лептин рецептора (LEPR),
- експресија VEGF,
- експресија Ki67 и
- експресија CD105 / Микроваскуларна густина (MVD-Microvessel density).

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Величина узорка је прерачуната на основу података из студије Stoian-а и сарадника у којој је, имунохистохемијски, истраживана експресија Ki67 код различитих градуса ендометријалне неоплазије. Степен пролиферације ћелија је одређен помоћу индекса пролиферације Ki67 (IP-Ki67) при чему је најмања вредност овог индекса била 10% (код добро диферентованих неоплазија) а највећа 52% (код лоше диферентованих неоплазија). Студијски узорак је израчунат за дихотомно, независно обележје посматрања и χ^2 тест, уз ниво вероватноће алфа грешке 0,05, снаге студије на 0,8, за однос броја узорака у контроли и експерименталној групи 1:1, коришћењем одговарајућег рачунарског програма. На основу поменутих, задатих параметара, прорачунато је да је за прихватање радне хипотезе, да постоји разлика у експресији Ki67 (исказано као IP-Ki67) између две групе, потребно најмање 18 особа у експерименталној групи (оболели) и исто толико узорака у контролној групи. Узимајући у виду да експресија Ki67 зависи од степена диференцијације и стадијума неоплазије, укупни узорак је додатно увећан за двоструку вредност тако да је утврђен на најмање 72 испитаника, по 36 у свакој студијској групи.

2.7.6. Статистичка обрада података

За статистичка тестирања ће се користити статистички програмски пакет SPSS for Windows (18.0).

Најпре ће све варијабле бити описане класичним дескриптивним методама статистике. Атрибутивна обележја ће бити описана апсолутним и релативним бројевима а нумеричка обележја мерама централне тенденције (аритметичка средина и медијана) и мерама варијабилитета (стандардна девијација, минимална и максимална вредност). Добијени резултати биће приказани табеларно и графички.

За поређење атрибутивних обележја посматрања користиће се Pearson-ov χ^2 тест (таблице контингенције) или χ^2 тест слагања). Избор тестова за анализу нумеричких обележја посматрања зависи од природе њихове расподеле. У случају правилне расподеле за тестирање разлике између две групе користиће се *t*-тест, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем Mann Whitney U теста.

Једнофакторском анализом варијансе тестираће се разлика у вредностима нумеричких обележја посматрања која се понашају по типу нормалне расподеле а између посматране три и више група испитаника. За међугрупну анализу користиће се Bonferroni тест. Повезаност вредности експресије напред наведених маркера и посматраних општих карактеристика испитаника и клиничко-лошких карактеристика тумора, одређиваће се помоћу мултиваријантне линеарне регресије. Овом анализом одређиваће се и предиктори разлике у односу на испитиване антигене.

Гранична вредност за прихватање радне хипотезе биће постављена на $p < 0.05$

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекујемо да се утврди повезаност експресије LEPR са експресијом VEGF, Cyclinom E, CD105, Ki67 и са величином и метастатским потенцијалом ендометриоидног аденокарцинома.

Такође се очекује да ово истраживање омогући идентификацију потенцијалног прогностичког маркера, што пружа могућност индивидуализације антитуморског третмана.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Циљ истраживања је испитивање утицаја експресије рецептора за лептин (LEPR) на неоангиогенезу, регулацију ћелијског циклуса и пролиферацију ћелија у ендометриоидном аденокарциному.

Испитиваће се биопсијски узорци примарног ендометриоидног аденокарцинома ($n=36$), ендометријалне хиперплазије ($n=36$) и не-туморско у околини тумора ($n=36$). На

хистопатолошким резovima дебљине 4-5 μ , ће се применити класична H&E и имунохистохемијска ABC метода са анти Ob-R, анти VEGF, анти CD105, анти Ki67 и анти Cyclin-a E антителима.

За сваки појединачан случај ендометридног карцинома би се одредили уобичајени прогностички параметри. Након тога би се радила анализа експресије LEPR, VEGF-a, Cyclin-a E, Ki67 и густине микроциркулације (MVD) на основу експресије CD105. Добијене вредности би се користиле за испитивање утицаја експресије LEPR у односу на индекс пролиферације, микроваскуларну густину, регулацију ћелијског циклуса, као и у односу на класичне клиничко-морфолошке прогностичке параметре тумора.

Очекујемо да се утврди позитивна корелација експресије LEPR са испитиваним про-ангиогеним и пролиферативним антигеном, као и са густином микроциркулације у туморској и перитуморској строми чиме би се издвојила група пацијенткиња са повећаним ризиком за прогресију болести. Такође очекујемо да се утврди да ли постоји повезаност између LEPR експресије и регулатора ћелијског циклуса.

Резултати би унеколико расветлили улогу лептина у патогенези ендометридног аденокарцинома, идентификовали потенцијални прогностички фактор одговоран за агресивни туморски фенотип и евентуално указали на могућу нову стратегију антитуморског третмана.

3. Предлог ментора:

За ментора се предлаже проф. др Снежана Јанчић редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија.

Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Радови у вези са темом докторске дисертације:

1. Milosevic V, Vukmirovic F, Zindovic M, Krstic M, Milenkovic S, **Jancic S**. Interplay between expression of leptin receptors and mucin histochemical aberrations in colorectal adenocarcinoma. Rom J Morphol Embryol 2015;56(2):709-716.

2. Milosevic VS, Vukmirovic FC, Krstic MS, Zindovic MM, Lj Stojanovic D, **Jancic SA**. Involvement of leptin receptors expression in proliferation and neoangiogenesis in colorectal carcinoma. J BUON 2015;20(1):100-108.

3. **Jancic S** and Milosevic V (eds): Leptin- From Obesity to Carcinoma. Lambert Academic Publishing, 2016, pp 1- 67 (ISBN 978-3-659-90320-5)

4. Vuletic MS, **Jancic SA**, Ilic MB, Azanjac GLj, Joksimovic IS, Milenkovic SM, Janicijevic-Petrovic MA, Stankovic VD.:Expression of Vascular endothelial growth factor and microvascular density assessment in different histotypes of basal cell carcinoma.J BUON. 2014;19(3):780-6.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Патологија

5. 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. Доц др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

3. Доц. др Миљан Крстић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Патологија , члан

Закључак и предлог Комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публикованих радова, комисија закључује да др Јелена Лукић-Флора, испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.

2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита утицај експресије рецептора за лептин на неоангиогенезу, пролиферацију и регулацију ћелијског циклуса у ендометријском аденокарциному материце.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Јелене Лукић-Флора бити од великог научног и практичног значаја јер ће ближе дефинисати улогу лептина у патогенези ендометријског аденокарцинома, идентификовати потенцијални прогностички фактор одговоран за агресивни туморски фенотип и указати на могућности нових модалитета антитуморског третмана.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Јелене Лукић-Флора под називом **„Утицај експресије рецептора за лептин на неоангиогенезу и регулацију ћелијског циклуса ендометријског аденокарцинома“** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

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

2. Доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

3. Доц. др Миљан Крстић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Патологија, члан

У Крагујевцу, 12.08.2016