

1. Одлука Наставно–научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета Медицинских наука у Крагујевцу, број 01- 14219/3-9, од дана 24.12.2014. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Миљана Зиндовића, под називом:

“Компаративна анализа имунохистохемијске експресије Stathmina 1, Ki67, E-cadherina, p53 и bcl-2 у интестиналном и дифузног карциному желуца”

На основу одлуке Већа, предложена Комисија у саставу:

1. **Доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. **Доц. др Драгче Радовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
3. **Доц. др Миљан Крстић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

Подноси Наставно-научном већу Факултета следећи:

2.Извештај Комисије о подобности теме и кандидата

2.1 Биографија кандидата

Др Миљан Зиндовић је рођен 23.06.1979. у Подгорици. Основну школу и Гимназију је завршио у Подгорици са одличним успехом. Медицински факултет је завршио у Крагујевцу 2007. године, а последњи 12. семестар студија медицине завршио је на Медицинском факултету Универзитета Удине (Италија) на бази билатералне сарадње Медицинског факултета у Крагујевцу и факултета у Удинама. Докторске академске студије др Зиндовић је уписао школске 2007/08, а усмени докторски испит на смеру Онкологија положио 05.10.2009. године.

Обавезан лекарски стаж у трајању од једне године је обавио у Клиничком центру Црне горе (КЦЦГ). Од септембра 2008. до априла 2012. године је радио као доктор медицине у Хитној медицинској помоћи у Подгорици.

Специјализацију из Опште хирургије за КЦЦГ је добио априла 2012, а специјалистичке студије је уписао у мају 2012. године. Ради као лекар на специјализацији Опште хирургије у КЦЦГ.

Течно говори и пише енглески и италијански језик.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов:

“Компаративна анализа имунохистохемијске експресије Stathmina 1, Ki67, E-cadherina, p53 и bcl-2 у интестиналном и дифузном карциному желуца”

Предмет:

Предмет ове студије је испитивање утицаја експресије Stathmina 1 на адхезионе молекуле, индекс пролиферације, апоптотски индекс и експресију тумор супресорног гена p53 у интестиналном и дифузном типу желудачног карцинома, као и испитивање његове повезаности са класичним прогностичким параметрима (пол, старост, локализација и величина тумора, степен хистолошке диференцијације, стадијум по TNM класификацији) који су од значаја за туморску прогнозу.

Хипотеза:

Претпоставка је да између интестиналног и дифузног типа желудачног карцинома постоји разлика у експресији Stathmina1. Такође се претпоставља да је повишена експресија Stathmina 1 у позитивној корелацији са пролиферативном активношћу, односно са експресијом Ki67, а у обрнутој корелацији са експресијом E-cadherina, p53 и bcl-2. Претпоставка је и да је повишена експресија Stathmina 1 у позитивној корелацији са метастазама у лимфним нодусима и са удаљеним метастазама.

2.3. Подобност кандидата

Кандидат је објавио два рада у часопису са рецензијом у којима је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

1. **Miljan Zindović**, Slaviša Jančić, Sanja Knežević and Snežana Jančić. Peptide YY-cells in neuroendocrine tumours of rectum. *Medicus* 2005; 6(2):74-76 (**M52=1.5 бода**)
2. **Zindović M**, Milošević V, Žujović J, Vučković LJ, Kujović A i Lazović R. A rare giant extra-gastrointestinal stromal tumor (GIST) in young male patient. *Acta Medicae Medianae* 2014; 53(4): *In press.* (**M52=1,5 бода**)

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Иако је у патогенези желудачних карцинома опште прихваћен модел вишеетапне карциногенезе, од *H. pylori* индукованог хроничног гастритиса преко мултифокалне атрофије, интестиналне метаплазије и дисплазије до карцинома, назване “*Correa* секвенца“, ипак између интестиналног и дифузног типа карцинома

постоје бројне различитости, како у хистолошком обрасцу раста, тако и у биолошком понашању. За дифузни тип још увек није сасвим прецизирана преканцерозна лезија, он се састоји од слабо кохезивних ћелија које дифузно инфилтришу желудачни зид и формира мало или нимало жлезданих структура. Јавља се претежно код млађих пацијената, док је интестинални тип чешћи код старијих узрасних група. Такође, за разлику од интестиналних варијанти које показују тенденцију да метастазирају у јетру, дифузни тип се директно шири у перитонеум и суседне органе. Прогноза дифузног карцинома је предмет многих дебата у литератури. Саопштено је да дифузни карциноми обухватају лезије са различитом прогнозом: од нискостепених дезмопластичних типова без или са ретким ангио-лимфо-неуралним инвазијама, до високостепених подтипова са анапластичним ћелијама, али други аутори истичу његову значајно лошију прогнозу у односу на интестинални тип посебно код млађих одраслих. Поред ових сазнања намеће се и кључно питање, како хронична *H.pylori* инфекција изазива тако различите клиничке исходе?

Током *Correa* секвенце се дешавају поремећаји ћелијске пролиферације, диференцијације, адхезије и трансдукције сигнала са акумулацијом генетских алтерација, што у коначном исходу води у канцерску трансформацију, а да би дошло до малигне трансформације потребна је активација и сарадња већег броја онкогена.

2.5. Значај и циљ истраживања

А. Значај истраживања

1. На основу добијених резултата би било могуће издвојити болеснике са повишеним ризиком за прогресију болести, што је од значаја за постоперативни третман пацијената са интестиналним и дифузним карциномом желуца.
2. Идентификација прогностичких параметара пружа могућност индивидуализације антитуморског третмана, са постоперативном применом антагониста Stathmina 1, чиме би се отвориле нове перспективе превенције и терапије.

Б. Циљеви

Основни циљ ове студије је испитивање утицаја експресије Stathmina 1 на адхезионе молекуле, пролиферацију и апоптозу у интестиналном и дифузном карциному желуца. У складу са овим поставили смо следеће циљеве истраживања:

1. Испитивање дистрибуције интестиналног и дифузног карцинома желуца у односу на демографске карактеристике испитаника и у односу на стадијум по TNM класификацији.
2. Анализа интестиналног и дифузног карцинома желуца у односу на локализацију у желуцу и у односу на хистопатолошке карактеристике.

3. Имунохистохемијско испитивање експресије Stathmina 1, Ki67, p53, bcl-2 и E-cadherina у интестиналном и дифузном карциному желуца и у суседном нетуморском ткиву.
4. Анализа корелације експресије Stathmina1 са пролиферативним индексом, E-cadherinom, експресијом p53 и индексом апоптозе у интестиналном и дифузном карциному желуца и суседном не-туморском ткиву.
5. Корелација имунохистохемијске експресије Stathmina 1, Ki67, E-cadherina, bcl-2 и p53 у интестиналном и дифузном карциному са класичним прогностичким параметрима (из горе наведених тачака 1 и 2).

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Савремена методологија је омогућила истраживања на нивоу онкогена и тумор супресорних гена у интестиналној метаплазији и другим преканцерозним лезијама за желудачне карциноме. Један од онкопротеина који је јако ретко испитиван у желудачној карциногенези је Stathmin 1, микротубуларни регулаторни протеин са важном улогом у монтажи и демонтажи деобног вретена. Експресија Stathmina 1 у канцерским ћелијама је повезана са њиховом пролиферацијом и метастазирањем. Високо је експримиран у широком спектру хуманих карцинома па представља атрактивну мету за антиканцерску терапију.

Познато је да ћелијска адхезија има важну улогу у регулацији раста, диференцијацији и миграцији ћелија. Кључну улогу у ћелијској адхезији и у одржавању нормалних структура ткива имају кадхерини. Ћелијски адхезиони молекули E-cadherin је идентификован као супресор туморске инвазије и метастазирања. Губитак адхезивног молекула, E-кадхерина узрокује поремећај цитоскелета, повећава миграторну способност ћелија и омогућава њихово одвајање од тумора, што сугерише да промене у експресији E-кадхерина могу бити значајан показатељ туморске прогресије.

Пролиферација ћелија је пропорционална туморском расту и прогресији, а ретка су саопштења о томе да p53, осим улоге транскрипционог фактора и „чуvara генома“ (заустваља репликације оштећене ДНК), своју тумор супресорну активност испољава и кроз способност да модулише ћелијску миграцију. Губитак функције p53 повећава мотилитет ћелија што доприноси инвазивности тумора. Апоптоза је важан ниво контроле ткивне хомеостазе којом се елиминишу непожељне ћелије, а узрокована је деловањем p53. Ова функција долази до изражаја после излагања ћелија агенсима који оштећују ДНК. Ген bcl-2 са антиапоптотском функцијом је под нисходном регулацијом гена *Wild 53*. Превласт пролиферације над апоптозом обезбеђује раст и прогресију тумора. Постоји више доказа који подржавају хипотезу да изостанак апоптозе може бити важан фактор у еволуцији карцинома и лошег одговора на хемо- и радиотерапију.

У литератури нема података о повезаности Stathmin 1 са пролиферацијом, апоптозом, адхезионим молекулима и тумор супресором p53, у интестиналном и дифузном карциному желуца.

2.7. Методе истраживања

За истраживање ће се користити оперативни материјал ресектованих желудаца 90 пацијената оперисаних на Хируршкој клиници КБЦ Земун. У Служби за патологију КБЦ Земун је, према устаљеном протоколу, од сваког оперативног препарата, у зависности од величине, узимано од 5 до 15 биопсија, укључујући и по 2-3 биопсије околног здравог нетуморског ткива желуца. Након класичне фиксације у 4% неутралном пуферизованом раствору формалдехида, биопсијски материјал је рутински обрађиван у аутоотехнику, калупљен у парафинске блокове и архивиран по припадности свом патохистолошком случају.

Са парафинских блокова оперисаних болесника, ће се правити резони дебљине 3-4µ на којима ће бити примењене следеће методе:

- Рутинска Хематоксилин-Еозин метода (HE), на основу које би добили информације о хистопатолошком типу тумора, хистолошком градусу тумора, дубини инвазије, инвазији лимфатика, ангиоинвазији, перинеуралној инвазији, инфламаторном инфилтрату, дезмоплазији и некрози.
- Имунохистохемијска ABC метода са следећим примарним антителима: анти- E-cadherin, анти -Ki67 и анти- Stathmin 1, анти- p53 и анти- bcl-2 антителима.

Као позитивне контроле ће се користити узорци инвазивног карцинома дојке, који су раније вишеструко тестирани и сигурно садрже испитиване антигене. Као негативна контрола за имунохистохемијско бојење користиће се узорци ткива третирано не имуним серумом уместо примарног антитета.

За евалуацију експресије E-cadherina ће се узимати у обзир само ћелије са ситнозрнастим жуто-браон депозитима локализованим на ћелијским мембранама. Депозити E-cadherina који нису локализовани на ћелијској мембрани већ у цитоплазми се неће вредновати. Експресија E-cadherina ће бити одређивана на основу процента имунореактивних ћелија. Интрамембранозна имунохистохемијска реакција у <10% ћелија ће се сматрати негативном имунореакцијом (-); присуство интрамембранозне експресије у $\geq 10\%$ ће се сматрати позитивном реакцијом. Имунохистохемијска реакција присутна у <50% ћелија ће се класификовати као умерена експресија (1+), док ће се позитивна имунохистохемијска реакција у >50% ћелија класификовати као изражена експресија (2+) E-cadherina (Kanczuga-Koda и сар, 2014). На идентичан начин ће се радити и евалуација експресије bcl-2, али ће

се узимати у обзир интрацитоплазматска и/или перинуклеарна експресија овог маркера.

За одређивање вредности експресије Ki67 и p53 ће се узимати у обзир само пребојеност једара, док ће се за евалуацију експресије Stathmin1 узимати у обзир само пребојеност цитоплазме,

За одређивање густине Ki67, Stathmin 1 и p53 позитивних ћелија по ареи површине у mm^2 ће се користити многонаменски тестни систем M42 по Weibel-и. Објективним микрометром (Reichert Wien 2mm/200) је калибрисан тестни систем на микроскопу Olympus BH-2, на увећању 400 (10 окулар x 40 објектив), при чему је одређено мерно поље од $0,016\text{mm}^2$. За испитивање густине Ki67, Stathmin1 и p53 позитивних ћелија/ mm^2 ће се бројати сукцесивно по 5 „врхних тачака“. Апсолутна вредност густине позитивних ћелија у „врхној тачки“ ће се одређивати стереометријски (Mouton PR, 2011). Аритметичка средина добијених вредности „врхних тачака“ ће представљати коначан број позитивних ћелија у mm^2 за случај. Затим ће бити одређена медијана и испитаници ће бити подијељени у две групе: они са ниским степеном експресије (вредности мање или једнаке вредностима медијане) и они са високим степеном експресије (вредности веће од вредности медијане).

Експресија наведених маркера ће бити евалуирана од стране два истраживача.

А. Врста студије

Ретроспективна клиничко-експериментална студија.

Б. Популација која се испитује

У истраживање би било укључено 90 пацијента оба пола, који су оперисани због карцинома желуца на Хируршкој клиници КБЦ Земун. Из наведене популације најмлађи пацијент је мушког пола и у време операције је имао 41 годину, а такође и најстарији пацијент је мушког пола и у време операције је имао 84 године. Код 53 пацијента су верификоване метастазе у лимфним нодусима у време операције, док су удаљене метастазе детектоване код 4 пацијента. Пацијенти који ће бити обухваћени овим истраживањем су углавном са територије Републике Србије.

В. Узорковање

У овом истраживању би се користио биопсијски, оперативни материјал од почетка 2005. године закључно са 01.06.2014. године који је укалупљен у парафинске блокове и архивиран у Служби за патологију КБЦ Земун. На основу стандардних патохистолошких извјештаја из тог периода би формирали две експерименталне групе. Прву експерименталну групу (n=45) би чиниле оперативне биопсије пацијената са интестиналним типом аденокарцинома желуца. Другу експерименталну групу (n=45) би чиниле оперативне биопсије пацијената са дифузним карциномом желуца. Контролну групу како прве (n=45), тако и друге

(n=45) експерименталне групе у овој студији, би чиниле оперативне биопсије здравог ткива желуца (из околине тумора) које се према протоколу узимају из оперативног препарата достављеног Служби за патологију.

Г. Варијабле истраживања

Независне варијабле:

- Демографске карактеристике пацијената (старост и пол)
- Локализација тумора
- Макроскопски изглед тумора
- Хистолошки градус тумора
- Инвазија лимфатика
- Васкуларна инвазија
- Перинеурална инвазија
- Метастазе у регионалним лимфним жлијездама
- Метастазе у удаљеним органима
- Стадијум примарног тумора

Зависне варијабле:

- Експресија E-cadherina
- Експресија Ki67
- Експресија Stathmina 1
- Експресија p53
- Експресија bcl-2

Д. Снага студије и величина узорка

Величина узорка је прерачуната на основу података из студије Arévalo-а и сарадника. У овој студији истраживана је експресија E-cadherina код различитих типова карцинома желуца, а најмањи проценат позитивних узорака је био 40%. Студијски узорак је израчунат коришћењем одговарајућег рачунарског програма, за дихотомно, независно обележје посматрања и χ^2 тест. Ниво вероватноће грешке је установљен на 0.05, снаге студије на 0.8, разлике учесталости E-cadherina у два патолошка типа неоплазије је претпостављена на бар 30%, а однос броја узорака у контроли и експерименталној групи на 1:1. На основу задатих параметара, прорачунато је да је за прихватање радне хипотезе, да постоји разлика у експресији E-cadherina између две групе, потребно најмање 42 особе у експерименталној групи (оболели) и исто толико узорака у контролној групи. Узимајући у виду наведено, укупни узорак је установљен на 84 испитаника, по 42 у свакој студијској групи.

Ђ. Статистичка анализа података

Статистичка обрада резултата извршиће се помоћу комерцијалног програмског пакета SPSS (верзија 13). У анализи добијених резултата најпре ће се користити методе дескриптивне статистике за опис карактеристика узорка: апсолутни бројеви

и пропорције, мере централне тенденције (аритметичка средина) и мере варијабилитета (стандардна девијација). Нормалност расподеле ће се испитати *Kolmogorov-Smirnovim* тестом. За анализу сигнификантности разлика параметарских и непараметарских обележја, између и унутар група ћемо користити χ^2 -тест, *Mann-Whitney U* – тест, *Kruskal Wallis* – тест, *Studentov t* – тест. Уколико унакрсни приказ добијених параметара укаже на високо значајне везе у појединим узајамним односима, радиће се корелациона анализа (*Spearmanov* коефицијент корелације ранга, *Pearsonov* коефицијент корелације за параметарска обележја) којом би се одредила права мера њихове повезаности при чему ће се значајност везе доказати значајношћу коефицијента корелације, а јачина везе његовом величином. Применом ROC (Receiver Operating Characteristics) анализе одредиће се граничне вредности за нуклеарни пролиферативни антиген (Ki67), Stathmin1 и p53. Тестирање значајности биће одређено на нивоу вероватноће $p < 0.05$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

1. На основу добијених резултата истраживања биће могуће боље сагледавање сличности и разлика у адхезионим везама, пролиферативном и апоптотском индексу између интестиналног и дифузног карцинома желуца, што ће делимично разјаснити неке фенотипске разлике које постоје између ова два типа желудачног карцинома.
2. Очекује се да резултати покажу постојање везе између експресије Stathmina 1 и експресије Ki67, E-cadherina, p53 и bcl-2 у интестиналном и дифузном карциному желуца.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Карцином желуца је четврти по учесталости малигни тумор, а други, одмах иза карцинома плућа, узрок смрти од карцинома. Са стопом петогодишњег преживљавања мањом од 30%, карцином желуца је значајан здравствени проблем широм света. Настаје интеракцијом наследних фактора и фактора околине, при чему је у многим епидемиолошким студијама истакнута значајна повезаност овог тумора са навикама у исхрани, али најзначајнији помак у етиологији карцинома желуца је сазнање о његовој повезаности са *H.pylori* инфекцијом. Од многобројних класификационих система за желудачне карциноме, најчешће се примењује *Lauren-*ова класификација на интестиналне и дифузне.

Циљ ове студије је да испита корелацију између експресије Stathmina 1 са пролиферацијом, адхезионим молекулима, супресорним p53 и апоптотским bcl-2 протеином, као и да испита њихову повезаност са осталим клиничким и патолошким параметрима који су од значаја за прогресију и прогнозу интестиналног и дифузног карцинома желуца.

Истраживањем ће бити обухваћено 45 биопсијских узорка интестиналног и 45 узорка дифузног карцинома желуца. На хистопатолошким резевима дебљине 3-4 μ , ће се применити класична HE и имунохистохемијска ABC метода са анти Stathmin 1, Ki67, E-cadherin, p53 и bcl-2 антителима. За сваки појединачни случај ће се одредити уобичајени прогностички параметри: стадијум тумора, хистолошки градус, присутност лимфатичке, ангио- и перинеуралне инвазије, присуство метастаза у лимфним нодусима и удаљене метастазе. Након тога ће се радити квантитативна анализа експресије Stathmin 1, Ki67, p53 и bcl-2 и E-cadherina. Добијене вредности ће се користити за одређивање прогностичког значаја експресије Stathmin1 у односу на пролиферативни, апоптотски индекс и на адхезионе везе, као и у односу на класичне клиничке прогностичке параметре тумора.

На основу добијених резултата истраживања моћи ће боље да се сагледају сличности и разлике у адхезионим везама, пролиферативном и апоптотском индексу између интестиналног и дифузног карцинома желуца, што ће делимично разјаснити неке фенотипске разлике које постоје између ова два типа желудачног карцинома, а осим тога ће испитати утицај експресије Stathmina 1 на експресију Ki67, E-cadherina, p53 и bcl-2 у интестиналном и дифузном карциному желуца.

2.10. Предлог ментора

За ментора дисертације Комисија предлаже доц. др Миљана Крстића, доцента Медицинског факултета Универзитета у Нишу, за ужу научну област Патолошка анатомија

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Уже области: Онкологија и Патологија.

2.12. Научна област чланова Комисије:

1. доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник

2. доц. др Драгче Радовановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

3. доц. др Миљан Крстић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

Закључак и предлог Комисије

На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих резултата, кандидат др Миљан Зиндовић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Студија би била оригинално научно дело којим очекујемо да се утврди корелација експресије Stathmina 1 са пролиферативном активацијом, са експресијом E-cadherina, p53 и bcl-2, као и са метастазама у лимфним нодусима и са удаљеним метастазама, чиме ће се боље сагледати фенотипске различитости и сличности и утврдити прогностички параметри за интестинални и дифузни тип желудачног карцинома.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације др Миљана Зиндовића под називом: **“Компаративна анализа имунохистохемијске експресије Stathmina 1, Ki67, E-cadherina, p53 и bcl-2 у интестиналном и дифузном карциному желуца”** и одобри њену израду

Комисија:

- 1. Доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник

- 2. Доц. др Драгче Радовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

- 3. Доц. др Миљан Крстић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

У Крагујевцу, 20.01.2015. године