

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
КРАГУЈЕВАЦ

**1. Одлука Наставно научног већа Факултета медицинских наука , Универзитета у Крагујевцу.**

Одлуком Наставно научног већа Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, број 01-6596/3-2 од 10.07.2013 године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др мед. Наташе Здравковић Петровић под називом:

**" Експресија p16, p53 и VEGF и цитокински профил у колоректалном карциному и инфламаторним болестима црева"**

На основу одлуке Наставно научног већа, формирана је Комисија у саставу:

- 1. Доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, председник;
- 2. Доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;
- 3. Проф. др Срђан Ђурановић**, ванредовни професор Медицинског факултета, Универзитета у Београду, за ужу научну област Гастроентерохепатологија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно научног већу факултета Медицинских наука у Крагујевцу следећи:

## ИЗВЕШТАЈ

Кандидат др мед. **Наташа Здравковић Петровић**, испуњава све формалне услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за пријаву теме докторске дисертације.

### 2.1. Кратка биографија кандидата

Др мед. **Наташа Здравковић Петровић** је рођена у Крагујевцу. Завршила Медицински факултет у Крагујевцу 2000. год.. На истом факултету је завршила и специјалистичке студије из Интерне медицине 2004.год, као и субспецијалистичке студије из Гастроентерологије 2009. год. Уписала је докторске студије на Медицинском Факултету у Крагујевцу и положила све предвиђене испите као и усмени докторски испит.

## 2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

**Наслов:** "Експресија p16, p53 и VEGF и цитокински профил у колоректалном карциному и инфламаторним болестима црева". Наслов докторске тезе је савремен и актуелан и одсликава главне циљеве истраживања.

**Предмет:** Анализирати експресију p16, p53 и VEGF и цитокинског профила и њихову међусобну корелацију и са клиничким и хистопатолошким карактеристикама у колоректалном карциному и инфламаторним болестима црева

**Хипотеза:** Појединачна и комбинована експресија маркера p16, p53 и VEGF је у позитивној корелацији са клиничким и хистопатолошким карактеристикама док је концентрација цитокина у позитивној корелацији са повишеним маркерима ангиогенезе у ткиву колоректалног карцинома и запаљења слузнице црева.

## 2.3. Подобност кандидата

Кандидат је објавио 3 рада штампана у целини у домаћим и иностраним часописима (један као аутор и два као коаутор, међу којима се од значаја за пријаву теме докторске дисертације истиче рад у **часопису са рецензијом**, у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе:

Zdravkovic N, Živić Ž, Grbović V. Primarni maligni melanom jednjaka-prikaz bolesnika. Medicinski časopis 2010; 2:20-23.

## 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Тумор супресорски ген p53 је чувар интегритета генома и кључни медијатор процеса апоптозе. Резултати досадашњих истраживања указују на корелацију веће агресивности тумора и неповољније прогнозе болести са повећаном експресијом p53. Осим у колоректалном карциному, експресија p53 је значајан показатељ и активности инфламаторних болести црева и у позитивној је корелацији са степеном активности болести и степеном хистолошких промена упаљене слузнице колона.

Тумор супресорски ген p16 игра важну улогу у прогресији колоректалног карцинома. Код инфламаторних болести дебелог црева експресија p16 гена је у корелацији са степеном хистолошких промена слузнице црева и прогностички фактор за настанак дисплазије слузнице које представљају преканцерозну лезију. Учесталост мутација p53 и p16 расте са степеном хистолошких промена слузнице дебелог црева код запаљенских обољења и претходи појави малигнитета.

Један од главних ангиогених медијатора, који стимулише пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија крвних судова је фактор раста васкуларног ендотела (VEGF; од енгл. Vascular Endothelial Growth Factor). VEGF као мултифункционалан протеин, игра важну улогу у патогенези малигних обољења делујући првенствено у неоангиогенези и лимфангиогенези; пенетрацији малигних ћелија у циркулацију и њиховој дисеминацији; у анергији антитуморског имунског одговора. p53 и p16 имају двојну улогу у регулацији ангиогенезе. Нормални облици p53 и p16 смањујући експресију VEGF инхибирају ангиогенезу, док мутирани облици повећавају његову синтезу и стимулишу ангиогенезу.

Многа истраживања указују на повезаност Th1 имунског одговора и регресије тумора, док се прогресија тумора повезује са Th2 имунским одговором. Код запаљенских и малигних болести дебелог црева запажено је да постоји дизбаланс Th1/ Th2 имунског одговора са скретањем у правцу Th2 имунског одговора.

## 2.5. Значај и циљ истраживања

У пријављеној докторској тези јасно су постављени циљеви студије.

1. Испитати експресију p53, p16 и VEGF у ткиву пацијената са колоректалним карциномом и запаљенским процесима у колоректалној регији;
2. Утврдити могућу везу маркера p53, p16, VEGF са клиничко-патолошким параметрима и прогресијом болести;
3. Одредити концентрације IL-10, IL-12, IL-23, IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-27, IL-4, и TGF- $\beta$  у серуму и испитати да ли је евентуална модулација протуморског vs. антитуморског имунског одговора у вези са прогресијом болести код пацијената са колоректалним карциномом и запаљенским болестима црева;
4. Утврдити могућу корелацију серумских нивоа проинфламаторних (IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-23, IL-17) и регулаторних (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-27) цитокина са експресијом маркера ангиогенезе p53, p16 и VEGF;
5. Утврдити евентуалну разлику концентрације проинфламаторних цитокина у серуму као и експресије маркера ангиогенезе код болесника са карциномом у односу на запаљенске процесе у колоректалној регији.

## 2.6. Веза са досадашњим истраживањима:

Колоректални карцином представља један од најчешћих узрока морбидитета и морталитета. Класификације и установљени прогностички параметри који се данас користе у терапији колоректалног карцинома и запаљенским болестима црева не обезбеђују довољно информација о току и исходу болести, тако да постоји потреба за унапређењем постојећих и идентификацијом нових дијагностичких и прогностичких маркера. Важна је идентификација молекулских маркера који би пружили увид у прогресију болести. Клиничко-морфолошки параметри задржавају значај у дијагностичким процедурама. Проналажење нових дијагностичких и прогностичких маркера омогућили би бољи увид у прогресију болести и допринели би њиховом употпуњавању, у смислу примене у унапређењу скрининг програма ризичних категорија који би омогућили благовремено и успешно лечење.

## 2.7. Методе истраживања

### *Испитаници*

У студију ће бити укључени испитаници са колоректалним карциномом и запаљенским болестима дебелог црева који:

1. имају дијагностикован колоректални карцином верификован колоноскопским прегледом са биопсијама и потврђен патохистолошким прегледом;
2. који имају дијагностиковану запаљенску болест црева (улцерозни колитис и Кронуову болест) верификовану колоноскопским прегледом са биопсијама и потврђену патохистолошким прегледом;
3. имају потписан добровољни пристанак за учешће у студији.

Из студије ће бити искључени:

1. испитаници са рецидивантним туморима дебелог црева;
2. испитаници са колоректалним карциномом код којих је спроведена зрачна и хемиотерапија;
3. испитаници са запаљенским болестима дебелог црева који су претходно користили терапију (антибиотике, аминосалицилате, кортикостероиде, имуносупресивне лекове и биолошку терапију).

У студију ће бити укључени сви болесници којима је током колоноскопског прегледа дијагностикован колоректални карцином или запаљенско обољење црева, што ће бити потврђено биопсијом *ex tempore*. Колоноскопски прегледи ће се обављати у Центру за гастроентерохепатологију, Интерне клинике, Клиничког центра Крагујевац, уз одговарајућу припрему болесника. Сви колоноскопски прегледи ће се изводити на колоноскопу марке Olympus ехега. Исти испитаници ће бити хоспитализовани у Центру за гастроентерохепатологију, Интерне клинике, Клиничког центра Крагујевац.

### Методологија

Свим болесницима са запаљенским процесима у колоректалној регији ће бити урађена лабораторијска анализа (реактанти запаљења- седиментација еритроцита, CRP (од енгл. C-reactive protein), комплетна крвна слика, биохемијске анализе, туморски маркери: СЕА (од енгл. Carcino-embryonic antigen), СА 19-9 (od engl. Carbohydrate antigen), а болесницима са колоректалним карциномом и АФР (од енгл.alpha-fetoprotein), стандардним узимањем венског узорка крви као и преглед столице на окултно крварење. За одређивање серумске концентрације цитокина, свим испитаницима венепункцијом узимаће се по 10 ml крви. Сви узорци серума чуваће се на -20°C. Концентрације IFN- $\gamma$ , IL-27, IL-23, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-17 и IL-6 у серуму испитиваће се одговарајућим комерцијалним ELISA тестом.

Сви болесници са улцерозним колитисом на бази процене активности болести према важећим стандардима Trueloves-а и Witss-а ће бити разврстани у једну од три категорије: болесници са благом болешћу (број столица мањи од четири са незнатним крварењем и минималном анемијом, нормалном телесном температуром и нормалним пулсом, седиментацијом мањом од 30 mm/сат и без системских манифестација), болесници са умерено тешком болешћу (број столица од четири до шест са знатнијим крварењем и анемијом, повишеном телесном температуром са тахикардијом, седиментацијом већом од 30 mm/сат, присутним екстраинтестиналним манифестацијама) и болесници са тешком формом болести (више од шест течних столица дневно са ректалним крварењем, високом температуром, дехидрирани са тежом анемијом и хипоалбуминемијом).

У току ендоскопског прегледа болесницима са улцерозним колитисом ће се одредити: захваћеност дебелог црева (1- улцерозни проктитис; 2- проктисигмоидитис; 3- левострани колитис; 4- панколитис) као и ендоскопски налаз по модификованом Вагон овом скору (0- нормална слузница; 1- губитак субмукозног васкуларног цртежа; 2- гранулирана и невулнерабилна слузница; 3- контактна вулнерабилност; 4- спонтано крварење и улцерације).

Сви болесници са Кроновом болешћу на бази процене активности болести према важећим стандардима CDAI (од енгл. Cronhs disease activity index) ће бити класификовани у три категорије: болесници у ремисији (<150), са умерено тешком болешћу (150-450), са тешком болешћу (>450). Критеријуми су следећи: број течних столица  $\times$  2; болови у трбуху (0- одсутна; 1-

блага; 2- умерена; 3- тешка) x 6; опште стање (0- добро, 1- умерено, 2- лоше, 3- врло лоше, 4- изразито лоше) x 6; екстраинтестиналне манифестације x 30; опијати као терапија (0- не, 1- да) x 4; палпабилне масе (0- не, 1- вероватне, 2- сигурне) x 10; хематокрит (мушкарци- 47, жене- 42) x 6; телесна тежина x 4.

Болесницима са Кроновом болешћу у току ендоскопског прегледа ће се одредити захваћеност дигестивног тракта (1- захваћеност танког црева; 2- захваћеност дебелог црева; 3- захваћеност танког и дебелог црева).

Свим болесницима за запаљенским процесом у колоректалној регији ће се урадити радиолошки преглед дебелог црева у циљу одређивања компликација (0- без компликација; 1- са компликацијама) у Служби за радиолошку дијагностику и присуство екстраинтестиналних манифестација (0- без екстраинтестиналних манифестација; 1- са екстраинтестиналним манифестацијама).

Свим болесницима са колоректалним карциномом ће бити урађен ултразвучни преглед стомака, радиографски преглед плућа и срца, компјутеризована томографија стомака. Ултразвучни прегледи стомака ће бити рађени у Центру за гастроентерохепатологију, уз одговарајућу припрему. Радиографски прегледи срца и плућа и компјутеризована томографија стомака ће бити рађени у Служби за радиолошку дијагностику по стандардним протоколима. Сви болесници са верификованом слободном течношћу у стомаку ће бити пунктирани и пунктат ће бити послат у Службу за патологију где ће се уради анализа пунктата на малигне ћелије.

У току ендоскопског прегледа узимаће се ткивни исечци за имунохистохемијску и патохистолошку анализу (5 узорака, величине 4-5 mm/узорку, по испитанику). Одређивање нивоа експресије p53, p16 и VEGF обавиће се имунохистохемијском техником на парафинским исечцима. Ткива ће бити рутински фиксирана у формалдехиду, дехидрирана градираним алкохолем, очишћена ксилолом и уграђена у парафин. За имунохистохемијску анализу парафирани узорци ткива ће бити сечени на 4-5 микрона, а затим ће се урадити депарафинизација. Другим речима, ткивне исечке ћемо потапати у ксилолу и у опадајућим концентрацијама алкохола (100%, 96%, 70% и 50%). У циљу демаскирања антигена исечке ћемо третирати у цитратном пуферу (pH 6.0) у микроталасној пећници. Када се препарати охладе и исперу у раствору PBS-а, инкубираће се са примарним антителима 1 сат на собној температури у влажној комори. Користићемо одговарајућа антихумана моноклонска антитела (антихумано- p53, антихумано- p16 и антихумано- VEGF антитело). Затим ће се за њихову детекцију користити ABC систем. Ткивни пресеци ће се анализирати конвекционалним микроскопирањем.

Бојење ће бити дефинисано као позитивно када је више од 10% туморских ћелија обојено и негативно када је мање од 10% туморских ћелија обојено.

У циљу одређивања серумских вредности цитокина међу здравим индивидуама, одабрано је 30 испитаника међу добровољним даваоцима крви Клиничког центра Крагујевац. За одређивање експресије туморских маркера у ткиву, контролне групе нема, јер није сматрано етичким радити инвазивну процедуру ради биопсије здравим индивидуама.

#### *Статистичка анализа података*

У зависности од нормалности расподеле, разлике између група анализираћемо или непараметријским Mann-Whitney тестом, или параметријским независним Т-тестом. Нормалност расподеле вредности унутар група анализираћемо Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk тестовима. Вредност p мању од 0.05 рачунаћемо као статистички значајну. За статистичку обраду свих података користиће се SPSS пакет, верзија 16.0. У зависности од потреба истраживања користиће се табеларни и графички приказ дистрибуције података.

## 2.8. Очекивани резултати докторске дисертације:

Очекује се позитивна корелација експресије p16, p53 и VEGF и клиничко-хистопатолошких карактеристика код оболелих од карцинома и запаљенских болести колоректалне регије.

Очекује се позитивна корелација концентрације проинфламаторних цитокина у серуму болесника са карциномом и запаљенским процесима у колоректалној регији са повишеним маркерима ангиогенезе, а негативна корелација регулаторних цитокина са повишеним маркерима ангиогенезе.

Очекују се и повећане концентрације проинфламаторних цитокина у серуму као и експресија маркера ангиогенезе код болесника са карциномом у односу на запаљенске процесе у колоректалној регији.

## 2.9. Оквирни садржај дисертације

Хронично запаљење је повезано са развојем и прогресијом тумора. Један од примера директне везе инфламације и тумора је хронична инфламаторна болест црева, као што је улцерозни колитис и Крнова болест, код којих постоји повећан ризик за развој тумора колоректалне регије. Основни садржај ове дисертације је да се испита да ли експресија p53, p16 и VEGF у колоректалном карциному може да послужи као прогностички маркер агресивности и метастатског потенцијала а у запаљенским болестима дебелог црева да послужи као показатељ степена активности болести и да ли је у позитивној корелацији са концентрацијама цитокина у серуму.

## 2.10. Предлог ментора:

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже доц др. Ивана Јовановића, доцента за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Доц др. Иван Јовановића поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и планираном методологијом, као и искуство и остварене резултате у развоју научно-наставног подмлатка.

## 2.11. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална интерна медицина

## 2.12. Научна област чланова комисије

Научна област чланова комисије одговара теми докторске дисертације.

1. **Доц.др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, председник;
2. **Доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;
3. **Проф. др Срђан Ђурановић**, ванредовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Гастроентерохепатологија, члан.

## **Закључак и предлог комисије**

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Наташе Здравковић Петровић под називом: **"Експресија p16, p53 и VEGF и цитокински профил у колоректалном карциному и инфламаторним болестима црева"** и одобри њену израду.

У Крагујевцу, 11.07.2013. године

### **ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ**

**1. Доц.др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, председник

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

-----  
**3. Проф.др Срђан Ђурановић**, ванредовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Гастроентерохепатологија, члан

-----