

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-962/32 од 20. 12. 2022. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Николе Остојића под називом:

„Значај полиморфизама гена за TOLL-LIKE рецепторе 3 и 4 за ток и исход болести код пацијената оболелих од меланома“

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је комисија у саставу:

1. **проф. др Слободан Милисављевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник;
2. **проф. др Немања Здравковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;
3. **проф. др Бошко Милев**, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Хирургија, члан.

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

2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат др Никола Остојић испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације

Меланом је један од најагресивнијих тумора који настаје трансформацијом меланоцита, ћелија које производе пигмент у кожи али и у другим ткивима који садрже меланоците. Меланом је тумор са високим метастатским потенцијалом управо због високе покретљивости ћелија. Процес малигне трансформације меланоцита је веома сложен и укључује бројне мутације у генима који регулишу пролиферацију, диференцијацију и апоптозу меланоцита, као и мутагено дејство ултравиолетног (УВ) зрачења.

Урођени имунитет представља прву линију одбране организма од патогена. Ову функцију омогућава фамилија Toll-like рецептора (енг- Toll-like receptors), која игра есенцијалну и интегралну улогу у кожи, омогућавајући учешће и урођеног и стеченог имунског одговора. Везивање PAMP/DAMP за TLR на површини и у антиген-презентујућим ћелијама, дендритичне ћелије и макрофаги, покреће њихову активацију како би након тога могле приказати антигене, пореклом од микроорганизама или малигних ћелија, Т-лимфоцитима. Следствено, тај процес узрокује активацију Т лимфоцита. Сматра се да TLR имају улогу у и развоју имунотолеранције малигних ћелија, одржавању микросредине тумора, као и развоју крвних судова у тумору који поспешују прогресију канцера. Експресија TLR-а није ограничена само на ћелије које учествују у имунском одговору, већ и на различите ћелије коже, укључујући кератиноците и меланоците. У ћелијама меланома је примећена поремећена експресија TLR 2, 3, 4.

Досадашње студије су показале да су најчешћи полиморфизми у TLR генима полиморфизми појединачних нуклетода. Присуство полиморфизама у TLR генима може утицати на њихову улогу и узроковати поремећај равнотеже између продукције проинфламаторних и анти-инфламаторних цитокина и иницирање анти-туморског имунског одговора. Најчешћи полиморфизми TLR3 гена су rs5743312 (C9948T), лоциран у интрону 3, и функционални rs3775291 (G13909A, L412F), у егзону 4. Замена TLR3 L412F доводи до замене аминокиселине леуцина у фенилааланин (L), што дестабилизује структуру протеина и утиче на активацију рецептора. TLR4 полиморфизам rs4986791 (C1196T, T399I) и rs4986790 (A896G, D299G), се налазе у егзону 3. TLR4 D299G полиморфизам, замењујући аспарагин (D) са глицином (G) на аминокиселини 299, утиче на секундарну структуру и смањује капацитет за иницијацију имунског одговора преко TLR4. Полиморфизам TLR4 T399I, који кодира промену треонина (T) у изолеуцин (I) на аминокиселини 399, нарушава спајање лиганда за TLR4. Повезаност полиморфизама TLR3 и TLR4 са предиспозицијом за појаву канцера и прогнозом је претходно истраживана код већег боја типова солидних тумора. Међутим, недовољно је испитана повезаност полиморфизама TLR3 и TLR4 гена са током и исходом болести пацијената са меланомом. Стога је један од основних циљева овог истраживања испитивање повезаности генетских варијација у генима TLR3 (rs5743312 и rs3775291) и TLR4 (rs4986790 и rs4986791) са прогресијом болести и преживљавањем код пацијената са меланомом.

2.2. Процена научног доприноса и крајњег исхода

Најчешћи полиморфизми у TLR генима су полиморфизми појединачних нуклетода што је показано у бројним истраживањима. На основу досадашњих сазнања из литературе, претпостављамо да ће се код пацијената оболелих од меланома у I/II/III стадијуму детектовати полиморфизми гена за TLR3 и TLR4 рецепторе. Такође, очекујемо да је присуство полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 рецепторе чешћа код пацијената са одређеним клиничко-патолошким карактеристикама или факторима ризика.

Најзначајнији допринос овог истраживања може бити то што ће нам пружити нова сазнања о повезаности полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 са током и исходом болести пацијената са меланомом и што се очекује идентификација полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 као прогностичке маркере за краће укупно преживљавање пацијената са меланомом и повезаност полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 са метастазама у лимфним чворовима и узнапредовалим стадијумом тумора.

2.3. Наслов, циљ(еви) и хипотеза(е) докторске дисертације

Наслов: „Значај полиморфизама гена за TOLL-LIKE рецепторе 3 и 4 за ток и исход болести код пацијената оболелих од меланома”

Циљеви:

1. Утврђивање учесталости генотипова полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 у групи болесника са меланомом
2. Испитивање повезаности полиморфизма гена за TLR3 и TLR4 са клиничко-патолошким карактеристикама примарног тумора (локализација, хистолошки тип тумора, дебљина тумора по Бреслоу, присуство улцерације, митоза по мм²).
3. Корелација између полиморфизма гена за TLR3 и TLR4 са демографским факторима, полом и годинама пацијената.
4. Испитивање повезаности испитиваних полиморфизма са факторима ризика за настанак меланома (фототип коже, боја очију и косе, претходна анамнеза о меланому), изложеност УВ зрачењу (континуирано и интермитентно).
5. Утврдити постојање повезаности између испитиваних полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 са прогресијом меланома, односно разлике у учесталости полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 оболелих од меланома у другом и трећем стадијуму болести.
6. Утврдити постојање повезаности између полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 са преживљавањем и исходом болести пацијената оболелих од меланома.

Хипотезе:

1. Код пацијената оболелих од меланома у I/II/III стадијуму могу се детектовати полиморфизми гена за TLR3 и TLR4 рецепторе.
2. Присуство полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 рецепторе се јавља чешће код пацијената са одређеним клиничко-патолошким карактеристикама или факторима ризика
3. Постоји корелација између полиморфизма гена за TLR3 и TLR4 рецепторе и тока болести.

2.4. Методе истраживања

2.4.1. Врста студије

Истраживање ће бити спроведено по типу проспективне, клиничке и неинвазивне студије.

2.4.2. Популација која се истражује

Истраживањем ће бити обухваћени испитаници популације Србије са дијагностикованим меланомом класификованим по најновијој ТНМ класификацији болести из 2017.године. Студијску групу чиниће 120 пацијената оболелих од меланома. Болесници су лечени и праћени у оквиру Амбуланте за меланом, Клинике за кожне и полне болести, Клинике за пластичну и реконструктивну хирургију, Института за патологију и судску медицину, Одсека за молекулску медицину Института за

медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду у периоду од 2016. до 2019. године. Пре спровођења студије план и протокол истраживања су достављени надлежном Етичком комитету ВМА ради мишљења и сагласности. Одобрење Етичког комитета ВМА за прикупљање узорака и спровођење клиничког истраживања добијено је 22.10.2014. године.

2.4.3. Узорковање

У истраживање је укључено 120 болесника са дијагностикованим меланомом који су класификовани по стадијуму болести (I, II и III стадијум болести). Болесници се прате у оквиру Амбуланте за меланом, Клинике за кожне и полне болести, Клинике за пластичну и реконструктивну хирургију, Војномедицинске академије у Београду. У истраживање су укључени испитаници старије доби од 18. година, мушког и женског пола, којима се сем стандардних прегледа узимају узорци периферне крви са антикоагулансом у запремини од 2 мл на Институту за биохемију у Војномедицинској академији.

2.4.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле:

Независне варијабле (узрок) су представљали генотипови, односно алелске варијанте испитиваних гена.

Зависне варијабле:

Зависне варијабле су клиничко-патолошке карактеристике: (локализација, хистолошки тип тумора, дебљина тумора по Бреслоу, присуство улцерације, митоза по мм², итд.

Збуњујуће варијабле:

Збуњујуће варијабле односно додатни фактори који утичу на појаву меланома су представљале демографске карактеристике болесника: старост и пол.

2.4.5. Снага студије и величина уорка

Прорачун студијског узорка је учињен за проспективну студију (на основу прелиминарне анализе) посебно коришћењем одговарајућег рачунарског програма, уз вероватноћу α грешке од 0.05, снагу студије 0.80, и дихотомно обележје посматрања (χ^2 тест). Програми коришћени за снагу студије и прорачун величине узорка за генетичке студије су Power and Sample Size Calculations (Version 3.0) и UCLA stat calculator (<http://calculators.stat.ucla.edu>), (Sham PC, Purcell SM. Statistical power and significance testing in large-scale genetic studies. Nat Rev Genet. 2014;15(5):335-46.) На овај начин, добијен је минимални број испитаника од 80 (снага студије 0.80). Да би узорак био довољно велики определили смо се да број оболелих буде 120.

2.4.6. Статистичка анализа

Статистичке анализе ће бити обављене коришћењем софтвера SPSS, верзија 20.00 (SPSS Inc., Chicago, ИЛ, УСА). Анализа генотипске контингенције за три генотипа (хомозиготни изворни генотип (wt), хетерозиготни генотип и мутирани хомозигот), вршиће се тростерним табелама контингенције, помоћу хи-квадрата. Kaplan-Meier криве преживљавања ће бити упоређиване помоћу log-rank теста. Однос

ризика смртног исхода (енг. hazard risk ratio, HR) ће бити процењиван Сох-овом регресионом анализом, са 95% интервалом поверења (95% CI). HR се сматра значајним и повезаним са лошијим преживљавањем за р-вредност мању од 0,05, и интервалом поверења који укључује опсег вредности изнад 1. Варијабле за које се у униваријантној анализи буду значајне, укључујући оне са нивоима значајности испод 20%, накнадно ће бити анализирани у мултиваријантној Сох-овој регресионој анализи. Разлике ће се сматрати значајним када су р вредности мање од 0,05.

2.5. Значај истраживања за развој науке

Према доступним подацима из литературе до сада није испитиван полиморфизам гена за TLR3 и TLR4 код пацијената са меланомом у нашој популацији, као ни у региону и могу бити значајни у циљу утврђивања прогностичких параметара. Овом студијом очекујемо идентификацију полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 као прогностичке маркере за краће укупно преживљавање пацијената са меланомом и повезаност полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 са метастазама у лимфним чворовима и узнапредовалим стадијумом тумора. Сматрамо да наши резултати, потврђени у већим студијама, могу бити значајни у персонализованом приступу у терапији меланомом. Осим тога, тренутно се тестирају агонисти TLR3/4 као адјуванси за нове вакцине против канцера, где терапијски одговор пацијента може зависити од његовог генотипа за TLR3 и TLR4 гене.

Резултати добијени у овој студији би тиме могли имати још већи клинички значај у будућности. Додатно, резултати овог истраживања имају велики потенцијал за публикавање у престижним научним часописима из области хирургије, имунологије и онкологије и могу бити основа за будућа истраживања сличног циља и дизајна.

2.6. Образложење теме докторске дисертације и оригиналност идеје

Досадашње студије су показале да су најчешћи полиморфизми у TLR генима полиморфизми појединачних нуклеотида. Присуство полиморфизама у TLR генима може утицати на њихову улогу и узроковати поремећај равнотеже између продукције проинфламаторних и анти-инфламаторних цитокина и иницирање анти-туморског имунског одговора. Повезаност полиморфизама TLR3 и TLR4 са предиспозицијом за појаву канцера и прогнозом је претходно истраживана код већег боја типова солидних тумора. На основу досадашњих сазнања из литературе, претпостављамо да ће се код пацијената оболелих од меланомом у I/II/III стадијуму детектовати полиморфизми гена за TLR3 и TLR4 рецепторе. Ипак, недовољно је испитана повезаност полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 са током и исходом болести пацијената са меланомом, као и полиморфизми гена за TLR3 и TLR4 код пацијената са меланомом у нашој популацији, што може бити значајно у циљу утврђивања прогностичких параметара.

Тема дисертације и планирано истраживање су оригинални јер досадашња истраживања нису била дизајнирана у смислу испитивања повезаности полиморфизама гена за TLR3 и TLR4 са прогресијом болести и преживљавањем код пацијената са меланомом.

2.7. Кратка биографија и научно истраживачки рад кандидата

Никола Остојић је школске 1993/94. уписао Медицински факултет Универзитета у Београду, а 2000. године је и завршио након чега му је додељена диплома о стеченом високом образовању и стручном називу ДОКТОР МЕДИЦИНЕ. Специјализацију из

пластичне и реконструктивне хирургије је уписао на Војномедицинској академији у Београду школске 2001/02, а исту завршио 2006. год. За начелника одсека за опекотине у Клиници за пластичну и реконструктивну хирургију Војномедицинске академије и асистента на предмету Пластична и реконструктивна хирургија, Медицинског Факултета, Војномедицинске Академије, Универзитета одбране у Београду изабран је 2022. године.

Више пута је боравио на стручном усавршавању у иностранству:

2019. Institute Jonson & Jonson, Akademiekliniken, Stockholm (Sweden).

Advanced education - In Hospital Training.

2016. Refinements in Microsurgical Breast Reconstruction with DIEP Flap Clinical Center Ljubljana (Slovenia). Advanced Course in DIEP and ALT Microsurgical Reconstruction of Breast, Head and Neck Surgery.

2012. Advanced applications of Medical Lasers in treatment of Vascular Malformations. Policlinico Militare Celio, Rome (Italy)

2011. Tissue cultures in Burn treatments. A.R.N.A.S Ospedale Civico, Palermo (Italy)

2008. Instructor in Microsurgical Advanced Procedures Advanced Course.

Serbian-Romanian advance Course in Microsurgery, Cluz (Romania)

2005. Advanced Course in Reconstructive Surgery of the Face and Congenital Malformations. San Rocco Clinic, Grono (Switzerland)

2004. Advanced Course in Aesthetic Surgery of the Face. San Rocco Clinic, Grono (Switzerland)

Докторске академске студије је уписао на Факултету медицинских наука у Крагујевцу школске 2007/08, године, изборно подручје Хирургија. Дана 16.07.2008. године је положио усмени докторски испит са оценом 10.

Др Никола Остојић је као први аутор објавила један рад категорије M23, и то:

1. **Ostojic N**, Stepic N, Rajovic M, Koncar J, Novakovic M. Melanoma and squamous cell carcinoma developing on a burn scar. *Vojnosanit Pregl* 2022; 79(3): 291–5. **M23**.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлажу се проф. др Ненад Степић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Хирургија. Наведени ментор поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и 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:

Проф. др Ненад Степић

1. Šuljagić V, Miljković I, Starčević S, **Stepić N**, Kostić Z, Jovanović D, Brusić-Renaud J, Mijović B, Šipetić-Grujičić S. Risk factors for *Clostridium difficile* infection in surgical patients hospitalized in a tertiary hospital in Belgrade, Serbia: a case-control study. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6:31. doi: 10.1186/s13756-017-0188-x.

2. Šijan G, Vojvodić A, Milićević S, Vučetić D, Petrov N, Kozarski J, Đorđević B, Ostojić N, Nikolić Ž, Mitrić B, Malivuković A, **Stepić N**. Platelet gel in wound treatment in patient with pemphigus vulgaris and Type 2 diabetes mellitus: Case report. *Dermatol Ther*. 2019;32(6):e13099. doi: 10.1111/dth.13099.
3. Jaukovic L, Rajović M, Kandolf Sekulovic L, Radulovic M, **Stepić N**, Mijuskovic Z, Petrov N, Ajdinovic B. Time to Procedure, Nuclear Imaging and Clinicopathological Characteristics as Predictive Factors for Sentinel Lymph Node Metastasis in Cutaneous Melanoma: A Single-Center Analysis. *Ann Plast Surg*. 2018;81(1):80-86.
4. **Stepić N**, Končar J, Rajović M. The influence of Dupuytren's disease fingers contracture degree on surgical treatment outcome. *Vojnosanit Pregl*. 2017;74(1):19-23.
5. Malivuković A, Novaković N, Lepić M, Minić L, **Stepić N**, Đorđević B, Rasulić L. Cranial reconstruction with prefabricated 3D implant after a gunshot injury: A case report. *Vojnosanit Pregl*. 2016;73(8):783-7.

4. Научна област дисертације

Медицина.

Предмет истраживања, циљеви, постављене хипотезе и методолошки приступ истраживању међусобно су усклађени, а предложени ментор има научне компетенције подударне са предметом истраживања.

5. Научна област чланова комисије

1. **проф. др Слободан Милисављевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник;
2. **проф. др Немања Здравковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;
3. **проф. др Бошко Милев**, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Хирургија, члан.

Сви предложени чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Николе Остојића имају стручне и научне компетенције подударне са предметом истраживања.

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, др Никола Остојић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

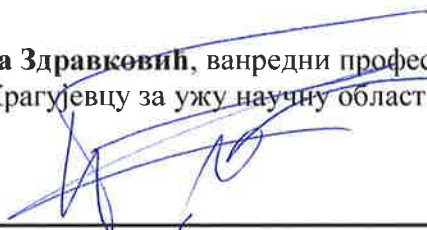
Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др Николе Остојића под називом „Значај полиморфизама гена за TOLL-LIKE рецепторе 3 и 4 за ток и исход болести код пацијената оболелих од меланома”

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

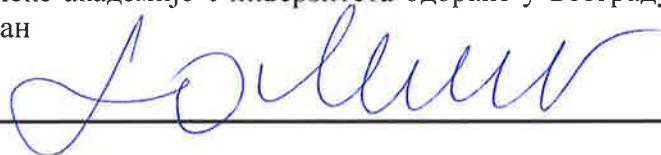
1. проф. др Слободан Милисављевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник



2. проф. др Немања Здравковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан



3. проф. др Бошко Милев, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Хирургија, члан



У Крагујевцу, 27.03.2023. године