

ПРИЈЕМАНО: 18.07.17			
Организација	Број	Прилог	Вредност
05	8881/4-4	4	

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-689/41, од 05.07.2017. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Далибора Јовановића, под називом:

„УЛОГА ЂЕЛИЈСКЕ СЕНЕСЦЕНЦИЈЕ ИНДУКОВАНЕ ОНКОГЕНИМА У МАЛИГНОЈ ТРАНСФОРМАЦИЈИ И ПРОГРЕСИЈИ ТУМОРА ДОЈКЕ”

Чланови комисије су:

1. **проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник
2. **проф. др Гордана Радосављевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
3. **проф. др Светислав Татић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Патолошка анатомија, члан
4. **доц. др Срђан Нинковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
5. **проф. др Берислав Векић**, професор по позиву Медицинског факултета Универзитета у Београду за област дигестивна хирургија, члан

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

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Лични подаци

Далибор Јовановић је рођен 30.11.1984. године у Крагујевцу. Медицински факултет у Крагујевцу је уписао школске 2003/2004 године, а завршио 25.12.2009. године са просечном оценом 9,21 (девет и 21/100), чиме је стекао стручно звање доктор медицине. Кандидат је од 2004 - 2009. године био стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, а 2008 – 2009. године је стипендиста фонда за младе таленте, Министарства омладине и спорта - стипендија за хиљаду најбољих студената у Србији.

Академске докторске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, смер Онкологија, уписао је школске 2010/2011 године. У току студија положио све испите предвиђене планом и програмом и 2012. године је положио усмени докторски испит са оценом 10. Тренутно на трећој години Академских докторских студија, смер онкологија.

Од 2011. године запослен је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, где до данас обавља послове сарадника за ужу научну област Патолошка анатомија.

Новембра 2012. године је уписао специјалистичке студије из Патологије на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Ангажован је као коистраживач на јуниор пројекту Факултета медицинских наука у Крагујевцу, под називом: Утицај сигналног пута IL-33/ST2 на неоангиогенезу у карциному дојке (ЈП 03-13).

Говори енглески и руски језик. Познаје рад на рачунару.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „Улога ћелијске сенесценције индуковане онкогенима у малигној трансформацији и прогресији тумора дојке”

Предмет: Анализа експресије белега ћелијске сенесценције узроковане онкогенима (енгл. *oncogene induced senescence* – OIS) и њен утицај на прогресију бенигну и малигну промена у дојци.

Хипотезе: Експресија белега OIS (p16, pRB – енгл. - *retinoblastoma protein*, p53 и p21) је значајно већа у карциному дојке него у бенигним променама; имунофенотип молекулских подтипова карцинома дојке је у корелацији са експресијом белега OIS (p16, pRB, p53 и p21); индекс пролиферације је у корелацији са експресијом белега OIS; експресија белега OIS (p16, pRB, p53 и p21) је у међусобној повезаности са стадијумом болести и хистоморфолошким карактеристикама карцинома дојке.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини у часопису категорије M23 који излази на једном од водећих светских језика у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Jovanović D, Ilić M, Milosavljević M, Mihajlović Z, Vojinović R, Mitrović S, Azanjac G. Dysplasia epiphysealis hemimelica: a case report. *Vojnosanit Pregl*, 2014; 71(11):1081-4. **M23**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Карциноми дојке су скуп хетерогених неоплазми различитог клиничког понашања и малигног потенцијала. И поред тога ово је један од најпроучаванијих модела онкогенезе, са познатим секвенцама од нормалне дуктолобуларне јединице, преко хиперплазије, атипичне хиперплазије и *in situ* карцинома, па све до његове прогресије у инвазивни и метастатски карцином. Досадашња истраживања базирана су и на проучавању молекулских подтипова карцинома дојке. Молекулски подтипови карцинома дојке имају различите патохистолошке и имунофенотипске карактеристике, као и различит одговор на терапију и сам исход болести.

У процесу малигне трансформације један од значајнијих процеса је и ћелијска сенесценција. Сенесценција, тј. ћелијско старење, се дефинише као трајни застој ћелијског циклуса у којем ћелије остају метаболички активне, а мењају фенотип. Велики број различитих белега и њихових комбинација може бити од користи за дефинисање ћелијске сенесценције како у култури тако и у ткиву. Највише коришћена метода за

откривање старења је детекција активности бета-галактозидазе, која је позната и као β -галактозидаза удружена са старењем (енгл. *senescence-associated beta-galactosidase*, SA β GAL). Други значајни белези за детекцију сенесценције су p16, p14^{ARF}, p53, p21, p15, p27 и хипофосфорилисани RB (pRB). Биолошка вредност сенесценције је у елиминацији нежељених ћелија, а процес је концептуално сличан апоптози. Примарни окидачи за сенесценцију повезану са старењем највероватније прате оштећење DNA (енгл. *deoxyribonucleic acid*), губитак протективне улоге теломера и дерепресија локуса *CDKN2A* (енгл. *cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*) који кодира p16. Сенесценцију узрокује велики број стимулуса који делују преко различитих сигналних путева, а многи од њих активирају p53. У основи њихове активности налази се улога инхибитора циклин зависне киназе p16, позната и као INK4A (кодиран са *CDKN2A*), p15, познат као INK4B (кодиран са *CDKN2A*), p21 познат као WAF1 (кодиран са *CDKN1A*) и p27 (кодиран са *CDKN1B*). Инхибиција комплекса циклин зависне киназе - циклина резултује застојем пролиферације при чему је круцијална компонента хипофосфорилисана форма pRB која је одговорна за учешће сенесценције у овом процесу. Постоје различити типови сенесценције у зависности од механизма који је изазивају, као што су репликативна сенесценција, сенесценција узрокована оштећењем DNA, узрокована стресом или онкогенима. OIS представља одбрамбени механизам који ограничава малигну трансформацију ћелија које поседују онкогени потенцијал и служи као почетна препрека за развој карцинома. OIS могу изазвати два врло важна сигнална пута, а то су: p16^{INK4a}-pRB и p14^{ARF}-p53-p21.

p16 и p14 су кодирани истим генским локусом *INK4A/ARF*. p16 и p14 су међусобно зависни, а оба су често измењена у примарном карциному дојке. Активација p53 узрокује транскрипциону активацију p21 и блокира циклин A, резултујући заустављањем циклуса у фази G1. Такође, неке студије су показала да је експресија p16, p14 и p21 карактеристична за многе туморе, укључујући и карцином дојке. Поменути белези сенесценције имају комплексну улогу у процесима туморогенезе и укључују бројне молекуле и сигналне путеве који на различите начине регулишу понашање ћелија и пут ка малигној трансформацији и каснијој агресивности тумора.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Значај ове студије је у утврђивању повезаности између експресије белега ћелијске сенесценције и имунофенотипско морфолошких карактеристика промена у дојци у циљу могућег предвиђања утицаја поменутих белега на малигну трансформацију, агресивност и прогнозу болести.

Циљ студије

Основни циљ овог истраживања је анализа експресије белега OIS у бенигним и малигним променама дојке. У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. Испитивање присуства ћелијске сенесценције у бенигним и малигним променама у дојци семиквантитативном имунохистохемијском анализом експресије SA β GAL.
2. Анализа експресије белега OIS (p16, pRB, p53 и p21) у бенигним и малигним променама у дојци, уз одређивање њихових међусобних односа.
3. Анализа утицаја експресије белега OIS на индекс пролиферације у бенигним и малигним променама семиквантитативном имунохистохемијском анализом експресије Ki-67.
4. Испитивање експресије белега OIS у различитим молекулским подтипovima инвазивног карцинома дојке (луминални А и Б тип, HER-2 позитивни и троструко негативни) уз одређивање могуће повезаности са имунофенотипским карактеристикама тумора, тј. експресијом рецептора за естрогене (енгл. *estrogen receptor* - ER) и прогестерон (енгл. *progesterone receptor* - PR), цитокератина (енгл. *cytokeratin* - CK5/6, CK7, CK8, CK19) и HER-2 (енгл. *human epidermal growth factor receptor 2*).
5. Испитивање повезаности експресије белега OIS са макроскопским и хистопатолошким карактеристикама карцинома дојке (величина тумора, нодални статус, хистолошки тип и градус, степен некрозе, дезмоплазије).

2.6. Веза са досадашњим истраживањима

Досадашње студије су показале разлику у експресији белега OIS у бенигним и малигним променама у дојци, као и корелацију наведених белега са молекулским подтипovima, индексом пролиферације, стадијумом болести и хистоморфолошким карактеристикама карцинома дојке. Истраживања показују да је експресија белега OIS значајно већа у карциному дојке него у бенигним променама, а такође и семиквантитативно одређивани скор имунохистохемијске анализе се повећавао у патоморфолошким секвенцама трансформације од бенигног ка малигну ткиву. Степен диференцијације тумора зависи од експресије OIS, забележена је ниска експресија p21 и значајно повећање експресије p16 у високоградусним карциномима дојке, при чему је прекомерна експресија p16 повезана са краћим укупним преживљавањем и временским периодом без знакова болести. Неки резултати указују да код високоградусних *in situ* промена, коекспресија p16 и p53 може бити значајна имунофенотипска особина која

фаворизује прогредирање у инвазивни малигни процес. Молекулски подтипови карцинома дојке показују различиту експресију OIS, а најубедљивији су резултати добијени анализом троструко негативних тумора за које се везује губитак експресије pRB и прекомерна експресија p16 на основу чега је предложена њихова примена у дијагностичко-прогностичке сврхе.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Клиничко-експериментална, ретроспективна, неинтервентна студија у области изучавања фундаменталних патогенетских механизма болести коришћењем патохистолошког материјала из постојеће архиве, по дизајну - студија пресека.

2.7.2. Популација која се истражује

У истраживање ће бити укључене пацијенткиње старости од 30 до 80 година, којима је у периоду од 1. јануара 2006.г. до 1. јануара 2010. године дијагностикован и патохистолошки потврђен карцином дојке или бенигна патоморфолошка промена. Експериментални део студије ће се изводити на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу и у Служби за патолошкоанатомску дијагностику, Клиничког центра Крагујевац. Истраживање је одобрено одлуком Етичког одбора бр. 01/17/2606.

Клинички подаци ће бити прикупљени увидом у историје болести и конзилијарне одлуке испитиваних пацијената.

Експериментални део студије спровешће се на ткивном материјалу добијеном након хируршког отклањања тумора или патолошки измењеног ткива дојке. Истраживање ће бити спроведено на 180 испитаница од чега 120 у експерименталној (малигни тумори) и 60 испитаника у контролној (бенигни тумори) групи. Као методе користиће се макроморфолошка и патохистолошка анализа тумора, стандарним методом бојења Хематоксилин/Еозин (H&E), а након тога и имунохистохемијским методом.

Патохистолошко испитивање

На H&E обојеним узорцима ткива анализираће се морфолошко-патохистолошке карактеристике бенигну и малигну промена, са одређивањем свих параметара од значаја за карцином дојке: хистолошког типа карцинома, диферентности тумора, митотског индекса, дезмопластичне реакције, мононуклеарне стромалне реакције, некрозе, инфилтрације околног ткива итд.

Имунохистохемијско испитивање

Имунохистохемијски метод ће укључити анализу експресије ER, PR, Ki-67, HER2 рецептора, као и белега сенесценције индуковане онкогенима (SA β GAL, p16, pRB, p53, p21) применом палете моно- и поликлонских антитела, према препорученим протоколима произвођача, коришћењем узорака ткива фиксираног у формалину, укалупљеног у парафин. Евалуација имунохистохемијске анализе биће урађена семиквантитативном проценом експресије испитиваних белега, скоровањем према специфичним скалама, тј. одређивањем процента ћелија које у цитоплазми и/или у једру експримирају одређени белег. За све белеге OIS биће одређена тачка раздвајања („*cut-off point*“) испитивањем експресије у контролној групи (ткивни исечци жлезданог ткива дојке без патоморфолошких промена). Експресија ER и PR биће квантификована на основу *Allred score*-а тј. сабирањем параметара који означавају процентуалну заступљеност позитивних ћелија (од 0 до 5) и интензитет експресије (од 1 до 3). Збир ових параметара представљаће укупни скор (од 0 до 8) при чему ће вредности ≥ 3 бити сматране као позитивне. Експресија Ki-67 ће бити одређивана на основу процента имунореактивних ћелија на основу кога ће се формирати групе са ниским (0-15%), умереним (16-30%) и високим пролиферативним индексом (31-100%). Експресија SA β GAL ће се квантификовати на основу процента позитивних ћелија (дифузно скор 2, фокално скор 1) помножен са интензитетом бојења (јак-3, умерен-2, слаб-1, негативно бојење - 0), при чему се добија скор од 0 до 6.

Сва имунохистохемијска бојења биће изведена уз контролу квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контрола према пропозицијама NordiQC (енг. *Nordic immunohistochemical Quality Control*). Микроскопска анализа тумора и оцењивање експресије белега вршиће се на микроскопу типа Carl Zeiss, Axioscop 40. Препарати са репрезентативним пољима, сликаће се коришћењем три микроскопска увељичања (x10, x20 и x40), помоћу камере Canon PC 1089.

2.7.3. Узорковање

Критеријуми за укључење пацијената у студију су патохистолошки верификоване бенигне и малигне промене у дојци.

Искључујући критеријуми за одабир испитаница су: непотпуни клинички подаци, пацијенткиње са мултипним синхроним и метакроним туморима, примењена преоперативна хемиотерапија и/или радиотерапија.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: експресија белега сенесценције у бенигним и малигним туморима дојке, испитивана имунохистохемијском анализом, а мерена семиквантитативним методом.

Зависне варијабле: имунофенотип малигнух ћелија карцинома дојке и пролиферативни индекс одређивани имунохистохемијском анализом и мерењем експресије ER, PR, HER2 и Ki-67 семиквантитативним методом.

Збуњујуће варијабле: варијабле везане за личну и породичну анамнезу; хистоморфолошке и клиничке карактеристике карцинома дојке.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун величине узорка је заснован на претпоставци разлике у учесталости експресије белега p16 код узорака малигнуог и бенигнуог ткива, од 15%, у односу на базалну вредност од 5%. Од свих праћених белега, код експресије p16 се очекује најмања разлика учесталости, а вредности базалне и експресије код малигнух тумора су процењене на основу података из публикованих студија сличног дизајна. За прорачун је коришћен одговарајући програм, са улазним параметрима алфа 0.05, снага студије 0.8, базална учесталост експресије код бенигнух тумора до 5%, очекивана учесталост код малигнух тумора најмање 20%, однос броја испитиваних узорака експерименталне и контролне групе 2:1. Сходно наведеном, процењено је да је потребан студијски узорак од 180 испитаника од чега 120 у експерименталној (малигни тумори) и 60 испитаника у контролној (бенигни тумори) групи. Имајући у виду да је очекивана разлика учесталости осталих белега p21, pRB, p53, знатно већа, наведени узорак има довољну снагу да докаже са статистичком значајношћу опсервиране разлике и у њиховој експресији између испитиваних група.

2.7.6. Статистичка обрада података

За статистичку обраду података добијених резултата биће употребљен комерцијални програмски пакет SPSS (верзија 22.0, SRSS Inc., Chicago, IL). У анализи добијених резултата користићемо: методе дескриптивне статистике, Studentov T test и/или Man-Whitney-jev test, ANOVA-у и/или Kruskal-Wallis-ov test, χ^2 test, Pearson-ov или Spearman-ov коефицијент корелације, мултиваријантну бинарну логистичку регресију, ROC криву (уз одређивање „cut off“ вредности, сензитивности и специфичности). Одређивањем сензитивности и специфичности теста биће детерминисан ниво практичне поузданости статистичке анализе. Дефинитивни избор статистичких метода зависиће од природе добијених резултата. Праг значајности (α) за сва статистичка израчунавања биће 0,05.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Ово истраживање ће својим резултетима показати да молекули и сигнални путеви белега OIS утичу комплексним механизмима на понашање како бенигну, тако и малигну трансформисаних ћелија. Очекује се да експресија белега OIS буде значајно већа у малигну туморском ткиву него у бенигну променама у дојци. Такође се очекује и да је експресија белега OIS у међусобној повезаности са молекулским подтипovima, индексом пролиферације, стадијумом болести и хистоморфолошким карактеристикама карцинома дојке.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Користећи ткивни материјал бенигну и малигну промена у дојци испитаће се присуство ћелијске сенесценције одређивањем SA β GAL, као и експресија белега OIS и њен утицај на прогресију бенигну и малигну промена у дојци. Такође ће се испитати и међусобна повезаност експресије белега OIS са најзначајнијим прогностичким параметрима и молекулским подтипovima карцинома дојке. Истраживање нам може омогућити бољи и свеобухватнији увид у биолошко понашање и малигни потенцијал различитих патолошких промена у дојци, а све у циљу боље контроле болести и ефикасније терапије.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже доц. др Слободанка Митровић, доцент Факултета Медицинских наука 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.

Радови у вези са темом докторске дисертације:

1. Milosavljevic MZ, Jovanovic IP, Pejnovic NN, **Mitrovic SL**, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ, Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget*, 2016; 7(14): 18106-18115.
2. Kapić Ivković T, Knezević Usaj S, Moldvaji E, Jovanić I, Milovanović Z, Milentijević M, Tatić S, **Mitrovic S**, Stojiljković M. Interlaboratory Concordance in HER-2 Testing: Results of a Serbian Ring-Study. First International Congress of Serbian Pathologists and Cytologists, Serbia 2016. *Materia medica*, 2016; 32(2); 1529-31.
3. Jovanovic D, Ilic M, **Mitrovic S**, Stankovic V, Azanjac G, Radovanovic D, Milosavljevic M. Correlation between molecular subtypes and clinicopathological features of breast cancers. First International Congress of Serbian Pathologists and Cytologists, Serbia 2016. *Materia medica* 2016; 32(2): 1565-66.
4. Jakovljević S, Spasić M, Milosavljević M, Azanjac G, Protrka Z, Radovanović D. and **Mitrovic S**. Pure Primary Osteosarcoma of the Breast: Report of a case. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 2013; 34 (5):476-79.
5. Ninković S, Azanjac G, Knezević M, Radovanovic D, Canović D, Nedović J and **Mitrovic S**. Lobular breast cancer in male with a previous history of irradiation due to Hodgkins disease. *Breast care*, 2012; 7: 315-318.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Онкологија.

5. Научна област чланова комисије

1. проф. др **Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник
2. проф. др **Гордана Радосављевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
3. проф. др **Светислав Татић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Патолошка анатомија, члан
4. доц. др **Срђан Нинковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
5. проф. др **Берислав Векић**, професор по позиву Медицинског факултета Универзитета у Београду за област дигестивна хирургија, члан

Закључак и предлог комисије


1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Далибора Јовановића, комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је оригинална и научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Резултати ове студије могли би да открију природу везе експресије белега ћелијске сенесценције индуковане онкогенима са имунофенотипско морфолошким карактеристикама промена у дојци, како би се постигао бољи и свеобухватнији увид у биолошко понашање и малигни потенцијал различитих патолошких промена у дојци, а све у циљу боље контроле болести и ефикасније терапије.
3. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу, да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Далибора Јовановића под називом: „Улога ћелијске сенесценције индуковане онкогенима у малигној трансформацији и прогресији тумора дојке“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ


1. **Проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник



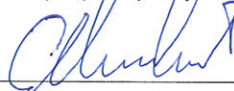
2. **Проф. др Гордана Радосављевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан



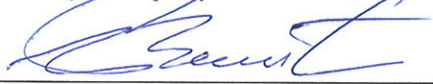
3. **Проф. др Светислав Татић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Патолошка анатомија, члан



4. **Доц. др Срђан Нинковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан



5. **Проф. др Берислав Векић**, професор по позиву Медицинског факултета Универзитета у Београду за област дигестивна хирургија, члан



У Крагујевцу, 10.07.2017.године