

Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-720/45, од 13.07.2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Милана Јовановића, под називом:

“Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести.”

Чланови комисије су:

- **проф. др Драган Чановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник;
- **проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан;
- **доц. др Братислав Трифуновић**, доцент Медицинског факултета ВМА 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:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Милан Јовановић је рођен у Крагујевцу 08.11.1976. године. Завршио је Средњу медицинску школу у Крагујевцу 1995. године, ученик генерације. Дипломирао је на Медицинском факултету у Крагујевцу 2001. године, са просечном оценом 9,97. Школу резервних официра СнС1 ВМА завршио је 2003. године, први у рангу, након чега је био управник у Гарнизонској болници у Ћуприји 2003-2005. , са службеном оценом 5,00. Био је на специјализацији из опште хирургије 2005-2010. , положио је са одличном оценом. Ради као специјалиста опште хирургије од 2010. (шест година) . Од 2016. је у чину потпуковника Санитетске службе Војске Србије. Вишегодишњи је секретар Хируршке секције СЛД-а. Објавио је 19 радова, од тога 8 на СЦИ листи, коаутор у три књиге. Тренутно је на трећој години докторских студија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, у фази одобрења докторске тезе. Три године је био сарадник у настави на предмету Анатомија на Медицинском факултету ВМА Универзитета одбране, а годину дана је асистент на предмету Хирургија на Медицинском факултету ВМА Универзитета одбране у Београду. Учествовао је на више конгреса у земљи и иностранству. Добитник је Плакете Српског лекарског друштва.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести.

Предмет: Предмет овог истраживања је испитивање корелације експресије про- и анти-инфламаторних цитокина и клиничко-хистопатолошких карактеристика код оболелих од карцинома колоректума.

Хипотезе: Серумске концентрације анти-инфламаторних цитокина у позитивној су корелацији са клиничким и хистопатолошким карактеристикама прогресивне болести; Концентрације анти-инфламаторних цитокина у фецесу у позитивној су корелацији са клиничким и хистопатолошким карактеристикама прогресивне болести; Концентрације про- и анти- инфламаторних цитокина у серуму и фецесу болесника са карциномом у колоректалној регији међусобно позитивно корелирају.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је испунио статутарне услове неопходне да би пријавио докторску дисертацију јер је као први аутор објавио рад у целини у часопису категорије M23, који излази на једном од водећих светских језика:

Milan Jovanović, Nataša Janjušević, Darko Mirković, Maja Vulović, Boško Milev, Miroslav Mitrović, Bratislav Trifunović. Giant primary retroperitoneal seminoma: A case report. *Vojnosanit Pregl.* 2016; 73(2): 205-207. (M23).

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Колоректални карцином (CRC) представља значајан узрок морбидитета и морталитета у свету и један је од најчешћих и најагресивнијих типова карцинома. Класификације и установљени прогностички параметри који се данас користе у терапији колоректалног карцинома 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. Тренутно, анализе фецеса нису ни високо сензитивне ни специфичне, а и колоноскопија је временски захтевна и не тако јефтина скрининг метода. Неколико серумских маркера је коришћено за дијагнозу и прогнозу болести, али још увек ни један није прилагођен рутинској употреби. Анти-туморски имунски одговор је регулисан бројним факторима, укључујући цитокине који могу да модулирају експесију туморских антигена, адхезионих молекула и продукцију имunosупресивних фактора туморских ћелија. Како цитокини делују на колоректални карцином није још увек у потпуности разјашњено.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Ово истраживање би требало да по први пут испита да ли и на који начин корелирају концентрације цитокина у серуму и фецесу болесника са карциномом.

Циљ студије

Основни циљ истраживања је да се испита корелација серумских и фецесних вредности цитокина IL-1b, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27 са стадијумом болести и клиничко-патолошким карактеристикама, код пацијената са колоректалним карциномом.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

- Анализирати концентрације IL-1b, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27 у серуму пацијената са колоректалним карциномом и корелацију добијених вредности са клиничким и патохистолошким карактеристикама болести;
- Анализирати концентрације IL-1b, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27 у фецесу пацијената са колоректалним карциномом и корелацију добијених вредности са клиничким и патохистолошким карактеристикама болести;
- Испитати међусобну корелацију системских и локалних вредности (у фецесу) IL-1b, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Забележене су повишене серумске концентрације цитокина, нпр. IL-8, IL-6, и тромбоцитног фактора раста (PDGF), код пацијената оболелих од колоректалног карцинома у односу на здраве особе, а за IL-6 и VEGF показано је да имају прогностичку улогу. Скорије студије су показале да су IL-12 и IL-23 сигнални путеви важни за диференцијацију наивних Т лимфоцита у IFN- γ продукуюће Th1 лимфоците, који показују анти-туморску активност. IL-23 индукује и пролиферацију активираних меморијских Т лимфоцита и продукцију IFN- γ . Такође, IL-23 фацититира продукцију проинфламаторног цитокина, IL-17, из активираних Т лимфоцита, за који је показано да помаже ангиогенезу и регулише продукцију различитих про-ангиогенетских фактора, укључујући васкуларни ендотелијални фактор раста. Активација IL-12 фамилије цитокина је примарно антагонизована IL-10. IL-10 је Тип-2 цитокин. Супримира Тип-1 имунски одговор и реципрочно увећава антителом-посредован одговор те на тај начин супримира анти-туморски имунитет домаћина. Претходне студије су показале да у унапредовалом стадијум колоректалног карцинома стимулисане мононуклеарне ћелије из периферне крви смањено продукую IL-12 што прати повећан ниво IL-10 у серуму. Ипак, прецизна улога IL-10 у биологији тумора остаје нејасна. Неке студије су показале да IL-10 има контроверзну, двоструку улогу у карциногенези људи, као тумор промовишући и тумор инхибишући фактор. С друге стране, IFN- α , главни цитокин урођеног имунског одговора, модулише одговор туморских ћелија и ћелија имунског система, укључујући и продукцију цитокина. Шта више, доказано је да IFN- α показује значајну анти-туморску активност и успешно се користи у анти-туморској терапији, укључујући и терапију карцинома дебелог црева. Бројна истраживања показују да IL-27 има имуно супресивни ефекат. Претпоставља се да он повећава продукцију IL-10, а супримира развој Th17 лимфоцита и синтезу проинфламаторних цитокина. Такође, показано је да IL-27 појачава не само анти-туморску активност стимулишући ефекторску функцију цитотоксичких Т лимфоцита и NK ћелија,

већ и инхибира ангиогенезу и пролиферацију ћелија меланома. Једно од ограничења студија које су испитивале серумске маркере запаљења је то што су се фокусирали само на један или неколико цитокина у времену посматрања. Анализираће ширег сета цитокина обезбедило би тачније информације о тумор-зависном имуном одговору, али такође и открило значај појединачних цитокина у имуном одговору против колоректалног карцинома.

2.7. Методе истраживања

Анализираће се: CRP, крвна слика, туморски маркери, локализација, активност болести, патохистолошки налаз, радиолошки налаз, компликације, екстраинтестиналне манифестације, ултразвучни преглед стомака, радиолошки преглед срца и плућа, TNM класификација тумора, концентрација IL-1b, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27 у серуму и фецесу (проточна цитометрија).

Врста студије

Планирана је компаративна-експериментална студија током које ће се упоређивати тестирани параметри у експерименталној и контролној групи испитаника.

Популација која се истражује

У студију ће бити укључени пацијенти са колоректалним карциномом (n=50) и група здравих испитаника (n=50).

Узорковање

У студију ће бити укључени испитаници са колоректалним карциномом који имају:

- дијагностикован колоректални карцином верификован колоноскопским прегледом са биопсијама и потврђен патохистолошким прегледом;
- потписан добровољни пристанак за учешће у студији.

Из студије ће бити искључени испитаници са:

- рецидивантним туморима дебелог црева;
- колоректалним карциномом код којих је спроведена зрачна и хемиотерапија;
- оболели од других малигних болести;
- оболели од акутних инфекција;
- оперисани у протекла четири месеца;
- пацијенти којима су трансплантирани органи, због строгих критеријума о донацији крви.

Студијске процедуре

У студију ће бити укључени болесници којима је током колоноскопског прегледа дијагностикован колоректални карцином, што ће бити потврђено биопсијом. Колоноскопски прегледи ће се обављати у Центру за гастроентерохепатологију, Интерне

клинике, Клиничког центра Крагујевац и у Клиници за гастроентерологију ВМА. Сви пацијенти у студији ће касније бити оперативно третирани у Клиници за општу хирургију КЦ Крагујевац или у Клиници за општу хирургију ВМА Београд, након чега ће се упоређивати дефинитивни ПХ налаз са клиничком сликом и вредностима цитокина у серуму и фецесу.

Свим болесницима ће бити урађене лабораторијске анализе (CRP (од енгл. C-reactive protein), комплетна крвна слика, биохемијске анализе, туморски маркери: СЕА (од енгл. Carcino-embrionic antigen), СА 19-9 (od engl. Carbohydrate antigen) и AFP (од енгл.alpha-fetoprotein), као и преглед столице на окултно крварење.

Мерење нивоа цитокина у серуму и фецесу

За одређивање концентрације цитокина, свим испитаницима венепункцијом узимаће се по 10 ml крви и из фецеса ће се центрифугирањем издвајати течна фракција. Сви узорци чуваће се на -20°C. Концентрације цитокина одређиваће се на проточном цитометру помоћу *Bio-Plex Pro Human pre-manufactured 27-Plex Cytokine Panel* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Кит садржи антитела специфична за цитокине: IL-1b, IL-2, IFN-γ, IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27. Метода ће се спровести према упутствима произвођача.

Варијабле које се мере у студији

Као *независне варијабле* пратиће се: пол, старост, лабораторијске анализе (CRP, комплетна крвна слика, јонограм, албумини, AFP, СЕА и СА19-9), локализација, активност болести, ендоскопски налаз, патохистолошки налаз, хистолошки тип, нуклеарни градус, радиолошки налаз, компликације, екстраинтестиналне манифестације, ултразвучни преглед стомака, радиолошки преглед срца и плућа, компјутеризована томографија, TNM класификација тумора.

Као *зависне варијабле* пратиће се: концентрације цитокина IL-1b, IL-2, IFN-γ, IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27 у серуму и фецесу.

Збуњујуће варијабле:

- удружене болести (дијабетес, повишен крвни притисак...)
- лекови које узимају пацијенти
- лабораторијске анализе крви (функција јетре и бубрега)
- навике пацијената (пушач, конзумирање алкохола, кафе)

Снага студије и величина узорка

Величина узорка је прорачуната на минимално 50 испитаника у свакој групи и израчуната је на основу података о вредностима серумске концентрације про-инфламаторног цитокина IL-10, публикованих у студији сличног дизајна.

Статистичка анализа

Подаци ће се анализирати коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. За поређење средњих вредности променљиве двеју популација користиће се параметарски *Student's t* тест, уколико вредности буду имале правилну расподелу, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем непараметарског *Mann-Whitney* теста.

Испитивање зависности две описне променљиве испитиваће се помоћу χ^2 и *Fisher*-овог теста. Испитивање утицаја више променљивих на бинарну променљиву помоћу мултиваријанте бинарне логистичке регресије.

Резултати експеримента ће се изражавати као вредност \pm стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.01$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Ово истраживање би требало да по први пут испита да ли и на који начин корелирају концентрације цитокина у серуму и фецесу болесника са карциномом.

Откриће нам да ли су IL-1b, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27 користни показатељи прогресије болести.

Очекује се позитивна корелација концентрације анти-инфламаторних цитокина у серуму и фецесу са клиничко-хистопатолошким карактеристикама карцинома колоректалне регије.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Улога цитокина у расту и прогресији колоректалног карцинома и модулацији имунског одговора није потпуно разјашњена.

Испитивањем пацијената са колоректалним карциномом, анализом туморских маркера, клиничко-патолошких карактеристика и релевантних цитокина у серуму и фецесу пацијената испитаће се повезаност концентрација про- и анти-инфламаторних цитокина (IL-1b, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27) у серуму и фецесу са прогресијом болести.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже **проф. др Дарко Мирковић**, редовни професор за ужу научну област Хирургија Медицинског факултета Министарства одбране 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:

- Jovanović M, Janjusević N, Mirković D, Vulović M, Milev B, Mitrović M, Trifunović B. Giant primary retroperitoneal seminoma: A case report, Vojnosanit Pregl. 2016; 73: 205-207.
- Trifunović B, Kršić J, Bezmarević M, Grbović D, Zeljković D, Nešković B, Soldatović I, Prelević R, Mirković D. Relationship between of short-course preoperative radiotherapy and serum albumin level and postoperative complications in rectal cancer surgery, Vojnosanit Pregl. 2015; 72: 663-669.
- Mirkovic D, Bezmarevic M, Pantic I, Vasiljevic V. Delayed bleeding due to hydatid cyst rupture one month after blunt liver trauma, Dig Liver Dis. 2015; 47: 13. doi: 10.1016/j.dld.2015.03.012.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Клиничка и експериментална хирургија

5. Научна област чланова комисије

- **проф. др Драган Чановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник;
- **проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан;
- **доц. др Братислав Трифуновић**, доцент Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Хирургија, члан.

Закључак и предлог комисије

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Милана Јовановића, Комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.

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 корелацију серумских и фецесних вредности цитокина IL-1b, IL-2, IFN-γ, IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27 са стадијумом болести и клиничко-патолошким карактеристикама, код пацијената са колоректалним карциномом.

Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Милана Јовановића бити од великог научног и практичног значаја у смислу испитивања постојања позитивне корелације између концентрације серумских и фецесних про- и анти- инфламаторних цитокина са клиничким и хистопатолошким карактеристикама колоректалног карцинома у прогресивном стадијуму, ради боље процене тока и прогнозе болести.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Милана Јовановића **“Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести.”** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

- **проф. др Драган Чановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник
-

- **проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
-

- **доц. др Братислав Трифуновић**, доцент Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Хирургија, члан
-

У Крагујевцу, 19. 09. 2016.