

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Презиме	16.10.17
Организација	Универзитет у Крагујевцу
Број	05
Серијски број	11989/1-7
Датум издања	

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-713/25 од 13.07.2017. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Милене Ракочевић под називом: „Утицај експресије рецептора за лептин на гене регулаторе ћелијског раста и организацију еластичних влакана у сквамозелуларном карциному коже“

Чланови комисије су:

1. Проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, председник;
2. Доц. др Ана Равић Николић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Дерматовенерологија*, члан;
3. Доц. др Миљан Крстић, доцент Медицинског факултета у Нишу за ужу научну област *Патологија*, члан;

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу следећи:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Милена Вулетих, удато Ракочевић, је рођена 13.08.1985. године у Крагујевцу, Република Србија. Основну школу и Гимназију је завршила у Крагујевцу са одличним успехом. Медицински факултет у Крагујевцу уписала је школске 2004/2005. године, а звање доктора медицине стекла је 29.09.2011. године. Током студија активно је учествовала у раду лабораторије за примењену и експерименталну кардиоваскуларну физиологију. Учествовала је на домаћим и страним конгресима. Након завршених студија обавила је обавезан приправнички стаж и положила стручни испит 2013. године. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписала је школске 2011/2012. године – изборно подручје Онкологија. Све испите предвиђене планом и програмом студија положила је са просечном оценом 8,83. Усмени докторски испит положила је 30.01.2017. године са оценом 9 (девет). Специјалистичке студије из уже научне области Патологија уписала је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, школске 2015/2016. године. За сарадника у настави за ужу научну област Патологија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу изабрана је 18.06.2012. године. Од јануара 2016. изабрана је у звање асистента за ужу научну област Патологија. У

активно је учествовала у извођењу експеримената и наставе на предмету Патолошка анатомија и Орална патологија, на свим студијским програмима. Руководилац је интерног-јуниор пројекта Факултета медицинских наука под називом „Микроморфолошко, хистохемијско и имунохистохемијско испитивање системских ефеката хиперхормонске хиперхемидемије“.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске дисертације

Наслов: „Утицај експресије рецептора за лептин на гене регулаторе ћелијског раста и организацију еластичних влакана у сквамозелуларном карциному коже“

Предмет: Значај експресије рецептора за лептин (енгл. leptin receptor, LEP-R) на ћелијску пролиферацију, неоангиогенезу, као и организацију еластичних влакана у сквамозелуларном карциному локализованом на фотоекспонираној и на не-фотоекспонираној кожи.

Хипотезе студије су:

1. Повећана експресија рецептора за лептин (LEP-R) је у позитивној корелацији са повећаном експресијом Ki67, p53 и микроваскуларном густином.
2. Повећана експресија рецептора за лептин је у позитивној корелацији са површином акумулираних еластичних влакана у околини сквамозелуларног карцинома коже.
3. Молекулски профил сквамозелуларног карцинома локализованог на фотоекспонираној и на не-фотоекспонираној кожи је различит.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је као први аутор објавила два рада у целини у часопису категорије M23 и M51 који излазе на једном од водећих светских језика, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе:

Vuletic M, Jancic S, Ilic M, Azanjac G, Joksimovic I, Milenkovic S, Janicijevic-Petrovic M, Stankovic V. Expression of vascular endothelial growth factor and microvascular density assessment in different histotypes of basal cell carcinoma. JBUON 2014; 19(3): 780-786. **M23**

Rakocević M, Popovska-Jovicic B, Jovicic T, Matic S, Azanjac G, Jovicic N, Stankovic V, Jancic S. Interplay Between The Immunohistochemical Expression Of P53 and Proliferation Index In The Keratinocyte Tumors Of The Skin. Ser J Exp Clin Res Doi: 10.1515/sjecr-2017-0020 **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Упркос релативно ниској стопи смртности сквамозелуларног карцинома коже, неке варијанте овог тумора често метастазирају у лимфне чворове, што за последицу има пораст морталитета оболелих. Дерегулација ћелијског циклуса је један од главних догађаја током канцерогенезе. Ћелијски циклус је строго регулисан процес који укључује многобројне контролне тачке којима се обезбеђује комплетна и прецизна репликација ДНК. Контролни систем истовремено спречава и прекомерну деобу ћелија. Климатске промене и оштећење

озонског омогача доводе до пораста UV и јонизујућег зрачења који индукују акумулацију генетских мутација, што резултује малигном трансформацијом кератиноцита. У расту и метастазирању тумора централни догађаји су ћелијска пролиферација и неоангиогенеза, регулисане балансом између стимулативних и инхибиторних фактора. Постоје бројна саопштења која истичу важну улогу лептина у туморској пролиферацији и неоангиогенези. Своје ефекте лептин остварује везивањем за специфични трансмембрански лептин рецептор (LEP-R). Повећана експресија овог рецептора је потврђена у многим бенигим и малигним туморима.

Лептин може имати важну улогу у регулацији цикличног обнављања епидерма, на шта указује повећана експресија рецептора за лептин код хиперпролиферишућих кератиноцита на маргинама ране. У анималним моделима показано је да локална примена лептина промовише зарастање ране на кожи која је изазвана хемијским супстанцама и то тако што са једне стране убрзава пролиферацију, диференцијацију и миграцију кератиноцита а са друге стране подстиче ангиогенезу у околини ране. Ова запажања су нас навела да, испитамо значај експресије LEP-R у пролиферацији и неоангиогенези сквамоцелуларног карцинома коже. Најчешће коришћен маркер пролиферације је нуклеарни антиген Ki67.

Регулаторни протеин p53, осим улоге „чувара генома“, као тумор супресор контролише ћелијско старење и апоптозу. На тај начин p53 спречава накупљање ћелија са оштећеном ДНК, као што је то у случају оштећења UV зрачењем. Подаци у литератури указују да губитак функције или мутација p53 утичу како на ћелијску миграцију тако и на инвазивност туморских ћелија. То је својство мутираних форми p53 и тај ефекат остварује интеракцијом са другим члановима p53 фамилије као што је p63.

Имајући у виду да у литератури нема довољно података о корелацији између експресије LEP-R и ћелијске пролиферације и неоангиогенезе у сквамоцелуларном карциному коже, циљ овог истраживања је да се испита повезаност експресије LEP-R са експресијом Ki67 и p53, као и са микроваскуларном густином у овој врсти карцинома коже.

С обзиром да током генезе сквамоцелуларног карцинома долази до деградације и накупљања еластичних влакана у околини тумора, испитали бисмо утицај експресије LEP-R на површину акумулираних еластичних влакана дерма у сквамоцелуларном карциному на фотоекспонираним (кожа лица, уха, подлактица и потколеница) и не-фотоекспонираним деловима коже.

2.5. Значај и циљ истраживања

Истраживање би омогућило сагледавање молекулског профила сквамоцелуларних карцинома локализованог на фотоекспонираној и не-фотоекспонираној кожи што може да послужи у издвајању потенцијалног предиктивног маркера, као и евентуалној индивидуализацији антитуморског третмана.

Основни циљ ове студије је да се испита значај експресије LEP-R у пролиферацији ћелија, неоангиогенези и организацији еластичних влакана у сквамоцелуларном карциному на фотоекспонираним и не-фотоекспонираним деловима коже. У складу са овим поставили смо следеће задатке:

1. Испитивање клиничко-патолошких карактеристика сквамоцелуларних карцинома локализованих на фотоекспонираној и не-фотоекспонираној кожи.
2. Анализом експресије LEP-R, Ki67, p53 и CD34 испитати повезаност експресије LEP-R са пролиферацијом ћелија и ангиогенезом.

3. Корелација експресије LEP-R, Ki67, p53 и CD34 са површином акумулираних еластичних влакана у околини сквамoцелуларних карцинома локализованих на фотоекспонираној и не-фотоекспонираној кожи.
4. Корелација експресије LEP-R, Ki67, p53 и CD34 са клиничко-патолошким карактеристикама сквамoцелуларних карцинома локализованих на фотоекспонираној и не-фотоекспонираној кожи.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Досадашња истраживања су показала да прогресивне промене климатских и еколошких услова доприносе смањењу озонског омотача, што за последицу има повећање UV и јонизујућег зрачења које оштећује ДНК и преко АТМ протеина и других ДНК зависних киназа индукује експресију p53. Основа улога p53 је у регулацији ћелијског циклуса, ћелијског старења и програмиране ћелијске смрти. У студији из 2011 године. (Patricia A. J. Muller и сар.) указују да p53 има могућност контроле ћелијске миграције и мотилитета, деловањем на друге чланове p53 фамилије. Губитак функције или мутација p53 гена је доказана у преко 50% малигних тумора. У канцерогенези ћелијска пролиферација и неоангиогенеза представљају кључне процесе, који су регулисани балансом инхибиторних и стимулативних фактора. Бројна саопштења указују на значај лептина у неоангиогенези и пролиферацији туморских ћелија. Лептин делује преко својих трансмембранских рецептора LEP-R, чија је експресија потврђена у многим бенигним и малигним туморима.

Сквamoцелуларни карциноми коже представљају око 20% свих карцинома коже, и док је прогноза примарне болести релативно добра, у метастатској болести петогодишње преживљавање износи око 34%. UV зрачење представља највећи епидемиолошки фактор ризика за сквamoцелуларни карцином коже. Поред тога показано је да повећано излагање UV зрацима доприноси дезорганизацији и акумулацији еластичних влакана, што може бити предиктор сквamoцелуларног карцинома коже.

2.7. Методе истраживања

2.7.1 Врста студије

У питању је ретроспективна, клиничко-експериментална, рандомизирана студија.

2.7.2. Популација која се истражује

У истраживање ће бити укључено 62 пацијента, оба пола, просечне старости 73 година. Пацијентима је ексцизијом одстрањен сквamoцелуларни карцином са фотоекспониране и не-фотоекспониране регије коже, на Хируршком одељењу Опште болнице у Чачку, у периоду од 1. јануара 2013. до 30. децембра 2016. године. Код 39 пацијената су

сквамоцелуларни карциноми били локализовани на фотоекспонираној кожи (кожа лица, уха, подлактица и потколеница), док је код 23 пацијента тумор био локализован на не-фотоекспонираној кожи. Пацијенти који ће бити обухваћени овим истраживањем су углавном из моравичког округа.

2.7.3. Узорковање

У служби за патохистологију и цитолошку дијагностику Опште болнице у Чачку је, према устаљеном протоколу, од сваког оперативног препарата, у зависности од величине тумора, узимано од 4 до 10 биопсија, укључујући и по 2-3 биопсије околног не-туморског ткива коже. Након класичне фиксације у 4% неутралном пуферизованом раствору формалдехида, биопсијски материјал је рутински обрађиван у ткивном процесору, калупљен у парафинске блокове и архивиран. Тумори локализовани на фотоекспонираним и не-фотоекспонираним деловима коже пролазе исти третман обраде ткива, хистопатолошку методологију и дијагностику.

Са репрезентативних парафинских блокова, би се правили резови дебљине 3-4 μ на којима би се примениле следеће методе:

- Хемагоксилин-Еозин метода (H&E), на основу које би добили информације о хистолошком градусу тумора и дубини инвазије.
- Verhoeff-van Gieson метода за диференцијацију еластичних влакана.
- Експресија LEP-R, Ki67, p53 и CD34 анализираће се имунохистохемијском техником. За њихову детекцију користиће се одговарајућа специфична антитела.

Критеријуми за укључење пацијената у студију су патохистолошки верификовани сквамоцелуларни карциноми коже. Из студије су искључени пацијенти са сквамоцелуларним карциномом коже који су пре операције били подвргнути зрачној терапији или парамедицинском терапијском третману.

Прву експерименталну групу би чинили тумори локализовани на фотоекспонираним регијама (кожа лица, уха, подлактица и потколеница); другу експерименталну групу би чинили тумори локализовани на не-фотоекспонираним регијама; контролну групу за обе експерименталне групе би чиниле биопсије околног не-туморског ткива коже.

Евалуација експресије LEP-R, Ki67 и p53 у туморском ткиву

- Експресија LEP-R ће бити одређивана на 10 видних поља а средња вредност добијена бројањем у десет видних поља је коначан резултат за случај. Резултати ће бити класификовани на следећи начин: 0, <10% позитивних ћелија (негативан налаз); 1+, 10-50% позитивних ћелија (умерена експресија); 2+, >50% позитивних ћелија (изражена експресија).

- За одређивање вредности експресије Ki67 и p53 ће се узимати у обзир само пребојеност једара. За одређивање густине Ki67 и p53 позитивних ћелија по јединици површине у mm^2 ће се користити тест систем M42 по Weibel-у. Објективним микрометром (Reichert Wien 2mm/200) је калибрисан тест систем на микроскопу Olympus BH-2, на увећању 400 (10 окулар x 40 објектив), при чему је одређено мерно поље од 0.016mm^2 . За испитивање густине Ki67 и p53 позитивних ћелија/ mm^2 ће се бројати сукцесивно по 10 „врућих тачака“. Апсолутна вредност густине позитивних ћелија у „врућој тачки“ одређиваће се стереометријски. Аритметичка средина добијених вредности „врућих тачака“ представљаће коначан број позитивних ћелија у mm^2 за случај. Одређивањем медијане испитаници би се поделили 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).

Квантификација микроваскуларне густине у туморском ткиву

Анализом експресије маркера ендотела крвних судова, CD34 одредиће се густина крвних судова у туморском ткиву (енгл. microvascular density, MVD). Обележене ендотелне ћелије или групација облежених ћелија које су јасно одвојене од суседних ћелија и ткивних елемената биће дефинисане као крвни судови.

На малом микроскопском увећању одредићемо места са највећом микроваскуларном густином („вруће тачке“), а потом на увећању x400 избројати крвне судове уз помоћ тест система M42 по Weibel-у, где је мерно поље 0.016mm^2 на микроскопу Olympus BH-2. Средња вредност добијена бројањем у десет видних поља би била коначан резултат за испитивани узорак, након чега би одредили медијану и поделили пацијенте на оне са ниским степеном ангиогенезе (MVD у тумору мања од вредности медијане) и оне са високим степеном ангиогенезе (MVD у тумору већа од вредности медијане).

Евалуација акумулације еластичних влакана

Количина акумулираних еластичних влакана у ткиву ће најпре бити анализирана на светлосном микроскопу, при чему ће се израдити микрофотографије које ће се користити за анализу помоћу ImageJ програма. Мерења ће бити рађена у три региона (у околини тумора) почев од дермо-епидермалне границе ка дубљим слојевима коже, прилагођено туморској маси. Средња вредност добијена мерењем у три видна поља представљаће количину акумулираних еластичних влакана по јединици површине за случај.

Евалуацију експресије наведених маркера би вршила два независна посматрача, а

уколико би разлика била већа од 10%, био би укључен и трећи.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: сквамoцелуларни карцином коже.

Зависне варијабле: Експресија LEP-R, Ki67, p53, CD34, и количина еластичних влакана по јединици површине у сквамoцелуларном карциному коже.

Збуњујуће варијабле: пол и старост испитаника, патохистолошке карактеристике карцинома и клинички параметри испитаника оболелих од сквамoцелуларног карцинома коже.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о експресији p53 у сквамoцелуларном карциному на фотоекспонираној кожи и у сквамoцелуларном карциному на не-фотоекспонираној кожи, а ови подаци су добијени из студије Panelos и сарадника 2008. Према подацима из литературе 70% ћелија сквамoцелуларног карцинома експримира p53 у фотоекспонираној кожи, док 30% ћелија сквамoцелуларног карцинома експримира p53 у не-фотоекспонираној кожи. Студијски узорак је израчунат узимајући да је $\alpha=0.05$, а снага студије $1-\beta=0.95$ (95%) за χ^2 тест, поредећи групе међу собом. Применом комерцијалног програма G Power v.3.0.10 утврдили смо да је за дате критеријуме неопходан узорак од најмање 56 пацијената.

2.7.6. Статистичка анализа

Статистичка обрада резултата извршиће се помоћу комерцијалног програмског пакета SPSS (верзија 20). 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-Smirnov-им 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 коефициента корелације а јачина везе његовом величином. Применом ROC (receiver operating characteristics) анализе одредиће се граничне вредности за нуклеарни пролиферативни антиген (Ki67), p53 и MVD.

Тестирање значајности биће одређено на нивоу вероватноће $p < 0.05$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

На основу доступне литературе очекује се да ће повећана експресија рецептора за лептин имати значај у пролиферацији ћелија и неоангиогенези. Поред тога очекује се повезаност експресије LEP-R са клиничко-патолошким карактеристикама тумора. Повећана акумулација еластичних влакана у околини сквамoцелуларних карцинома се очекује у туморима са повећаном експресијом LEP-R, Ki67, p53 и CD34.

2.9. Оквирни садржај дисертације

У овој студији испитиваће се значај експресије рецептора за лептин у пролиферацији ћелије, неоангиогенези и организацији еластичних влакана у сквамoцелуларном карциному коже. На биопсијском материјалу 62 пацијента са сквамoцелуларним карциномом локализованим на фотоекспонираним и не-фотоекспонираним регијама коже испитиваћемо корелацију између експресије LEP-R, Ki67, p53, CD34 и организације еластичних влакана, као и њихову повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама.

Истраживање би омогућило сагледавање молекулског профила сквамoцелуларних карцинома локализованог на фотоекспонираној и не-фотоекспонираној кожи што може да послужи у издвајању потенцијалног предиктивног маркера, као и евентуалној индивидуализацији антитуморског третмана.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Проф. др Снежана Јанчић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патологија. 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:

1. Rakocevic M, Popovska-Jovicic B, Jovic T, Matic S, Azanjac G, Jovicic N, Stankovic V, **Jancic S**. Interplay Between The Immunohistochemical Expression Of P53 and Proliferation Index In The Keratinocyte Tumors Of The Skin. Ser J Exp Clin Res Doi: 10.1515/sjecr-2017-0020.

3.1. Компетентност ментора

Радови у вези са темом докторске дисертације:

1. Rakocevic M, Popovska-Jovicic B, Jovic T, Matic S, Azanjac G, Jovicic N, Stankovic V, **Jancic S**. Interplay Between The Immunohistochemical Expression Of P53 and Proliferation Index In The Keratinocyte Tumors Of The Skin. Ser J Exp Clin Res Doi: 10.1515/sjecr-2017-0020.
2. Milosevic VS, Vukmirovic FC, Krstic MS, Zindovic MM, Lj Stojanovic D, **Jancic SA**. Involvement of leptin receptors expression in proliferation and neoangiogenesis in colorectal carcinoma. JBUON 2015; 20(1):100-8.
3. Milosevic V, Vukmirovic F, Zindovic M, Krstic M, Milenkovic S, **Jancic S**. Interplay between expression of leptin receptors and mucin histochemical aberrations in colorectal adenocarcinoma. Rom J Morphol Embryol. 2015;56(2 Suppl):709-16.
4. Vuletic M, **Jancic S**, Ilic M, Azanjac G, Joksimovic I, Milenkovic S, Janicijevic-Petrovic M, Stankovic V. Expression of vascular endothelial growth factor and microvascular density assessment in different histotypes of basal cell carcinoma. JBUON 2014; 19(3): 780-786.
5. Ljubenovic MS, Ljubenovic DB, Binic II, Jankovic AS, **Jancic SA**. Cutaneous tuberculosis and squamous-cell carcinoma. An Bras Dermatol. 2011;86(3):541-4.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа научна област Онкологија.

5. Научна област чланова комисије

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

Доц. др Ана Равић Николић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Дерматовенерологија*, члан;

Доц. др Миљан Крстић, доцент Медицинског факултета у Нишу за ужу научну област *Патологија*, члан;

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

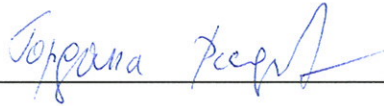
На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове, Комисија закључује да кандидат **др Милена Ракочевић** испуњава све услове прописане Статутом факултета и законом о Универзитету за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Комисија је у договору са потенцијалним ментором, предложеној тему изменила у погледу наслова, а направљене су и мање измене у делу циљеви, хипотезе и очекивани резултати у смислу јаснијег и прецизнијег образложења. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита значај експресије рецептора за лептин у пролиферацији ћелије, неоангиогенези и организацији еластичних влакана у сквамоцелуларном карциному коже. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.

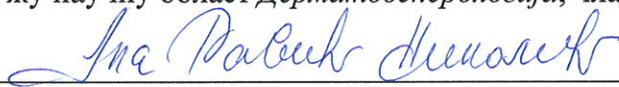
Комисија предлаже Наставно – научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата **др Милене Ракочевић**: „Утицај експресије рецептора за лептин на гене регулаторе ћелијског раста и организацију еластичних влакана у сквамоцелуларном карциному коже“ и одобри њену израду уз корекцију наслова у „**Значај експресије рецептора за лептин у ћелијској пролиферацији, неоангиогенези и организацији еластичних влакана у сквамоцелуларном карциному коже**“.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

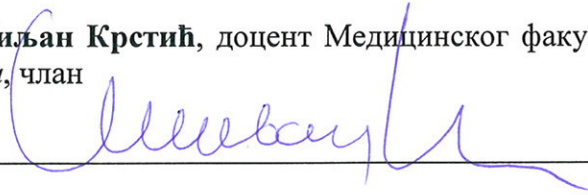
Проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, председник



Доц. др Ана Равић Николић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Дерматовенерологија*, члан



Доц. др Миљан Крстић, доцент Медицинског факултета у Нишу за ужу научну област *Патологија*, члан



У Крагујевцу, ~~20~~ 20.08.2017. године