

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМЉЕНО: 10.10.17		
Оргјед.	Број	Пријем
05	11732/1-1	1

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-713/23, од 13.07.2017.године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Неде Арсенијевић, под називом:

„Експресија VEGF-C, D2-40, Prox-1 и AdipoR1 у различитим стадијумима карцинома грлића материце“

Чланови комисије су:

1. Проф. др Зоран Протрка, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, 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 Ана Митровић Јовановић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, члан.

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

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Неда С. Арсенијевић рођена је 15.03.1983. године у Крагујевцу где је завршила основну школу и Прву крагујевачку гимназију са одличним успехом. Медицински факултет у Крагујевцу уписала је школске 2002/2003. године, а завршила 2009. године са просечном оценом 9,59 (девет и 59/100). Докторске академске студије уписала је

школске 2009/2010. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Онкологија. Од 01.08.2012. године обавља волонтерски рад на Клиници за гинекологију и акушерство Клиничког центра Крагујевац. У новембру 2013. године први пут је изабрана у звање сарадника у настави, а 2015. године је изабрана у звање истраживач сарадник за ужу научну област Гинекологија и акушерство. Активно учествује у извођењу практичног дела наставе на ИАСМ, ИАСС, ОСС, као и у организацији рада катедре за Гинекологију и акушерство. Током 2013. године била је ангажована на пројекту „DILS“ Министарства здравља. Студент је четврте године специјалистичких студија из Гинекологије и акушерства. Има положен усмени докторски испит, изборно подручје Онкологија.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Експресија VEGF-C, D2-40, Prox-1 и AdipoR1 у различитим стадијумима карцинома грлића материце“

Предмет: Испитивање експресије VEGF-C, D2-40, Prox-1 и AdipoR1 и њиховог утицаја на лимфангиогенезу и прогресију карцинома грлића материце.

Хипотеза: Појединачна и комбинована експресија тумор маркера VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1 је у позитивној корелацији са клиничким и хистопатолошким степеном напредовања премалигне у малигну лезију.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавила рад у целини у часпису категорије M51 у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву теме докторске дисертације:

Arsenijević N, Kastratović T, Živanović A, Đurić J, Šorak M. Adenosarcoma Mulleri associated with Tamoxifen use after breast cancer therapy- case report. Ser J Exp Clin Res, 2016; 17: 161-166. M51

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Сквамозни карцином грлића материце је један од најчешћих малигнитета и одговоран је за високу стопу морталитета. У развијеним земљама, због ефикасног цервикалног скрининг програма, неопластичне лезије се најчешће откривају и третирају у пре-инвазивном стадијуму (cervical intraepithelial neoplasia - CIN), а значајан број карцинома се открива док је још ограничен на цервикс.

Рак грлића материце развија се веома споро и у већини случајева потребно је 8 до 10 година да из фазе премалигне промене пређе у инвазивни карцином. Током тог времена, ни премалигне промене, ни почетни карцином не дају никакве симптоме. Због тога је једини начин да се ова болест открије у раној фази развоја редовни гинеколошки преглед и узимање бриса грлића материце за цитолошки преглед (Папаниколау тест).

Локално, тумор се може ширити кроз ткивне просторе или дуж суседних површина. Грлић има и веома богату лимфатичну мрежу која је нарочито изражена у мишићним слојевима и када тумор начини инвазију ових структура постоји већи ризик од дисеминације у регионалне лимфне судове, док хематогена дисеминација настаје много ређе.

Лимфангиогенеза је процес формирања нових лимфних судова *de novo* или из већ постојећих. Интратуморска лимфатична ендотелна ћелија је показала способност пролиферације што је указало на процес неолимфангиогенезе. Процена степена лимфангиогенезе врши се на основу густине лимфних судова (Lymphatic Vessel Density, LVD), а нарочито детекцијом специфичних маркера ендотелних ћелија лимфних судова. Недавно је пронађено неколико специфичних маркера лимфног ендотела као што су VEGF-C, Prox-1 и Podoplanin (D2-40) који су се показали корисним у процени присуства интратуморских лимфних судова као и Adiponectin чија улога у лимфангиогенези код карцинома грлића није прецизно дефинисана.

Према ФИГО калсификацији стадијум, величина тумора, инвазија и метастазирање у регионалне лимфне чворове представљају прогностички фактор дужине болести и укупног преживљавања код пацијенткиња оболелих од карцинома грлића.

VEGF-C (vascular endothelial growth factor C) - је димерни гликопротеин који припада VEGF породици цитокина. Пронађен је код јако агресивних тумора. Везивањем за свој рецептор VEGF-3 (Flt-4), VEGF C промовише лимфангиогенезу и тако убрзава метастазирање карцинома у лимфне чворове и удаљене органе. Рецептор VEGFR-3 експримиран је на лимфатичним ендотелним ћелијама и везивањем VEGF C

за рецептор долази до пролиферације лимфатичне ендотелне ћелије, њиховог преживљавања, миграције и формирања лимфног суда у процесу лимфангиогенезе. Захваћеност лимфних чворова представља најјачи прогностички фактор у различитим хуманим малигнитетима укључујући карцином грлића. Клиничке студије су показале да је експресија VEGF C блиско повезана са инвазивним фенотипом карцинома и да утиче на преживљавање пацијената оболелих од карцинома грлића. Недавно је доказано да је Flt-4 рецептор експримиран код различитих малигнитета укључујући и карцином грлића што је указало да је VEGF C укључен у туморску прогресију директним утицајем на туморску ћелију.

Prox-1 је кључни регулатор ендотелних ћелија лимфних судова током ембрионалног развоја. Експресија Prox-1 у једру лимфних и венских ендотелних ћелија као и у расутим ћелијама строме може се детектовати почевши од преканцерозних лезија као што су CIN 2 и CIN 3 па до микроинвазивног карцинома. Показана је значајна корелација између експресије VEGF-C у туморским ћелијама и нивоа експресије Prox-1 код лимфних ћелија позитивних на Prox-1. Превођење Prox-1 позитивне ћелије у лимфну ендотелну ћелију дешава се веома рано током прогресије цервикалне неоплазије што сугерише на рано присуство лимфних нодалних метастаза цервикалног карцинома.

Podoplanin је мембрански сијалогликопротеин који се састоји од 162 аминокиселине, а тежине је од 38 kDa. Експримиран је у многим нормалним ткивима као што је ендотел лимфних судова, плућа, плућа, срце, скелетни мишићи, постеллица, Шванове ћелије. Доказано је његово присуство и код широког спектра карцинома као што су ангиосарком, мезотелиом, тестикуларни тумор, сквамозелски карциноми. Специфично је експримиран је на ендотелу лимфних капиlara док га на ендотелу крвних судова нема. Скоро откривено моноклонално анти тело D2-40 може да детектује *podoplanin* и представља тренутно најупотребљеније антитело које демонстрира лимфни ендотел. D2-40 је селективни маркер ендотела лимфних судова и представља веома користан маркер лимфне инвазије код различитих малигнитета укључујући и карцином грлића. Степен лимфне инвазије на основу експресије D2-40 је користан прогностички фактор постојања нодалних метастаза. Лимфатична инвазија и метастаза лимфних чворова су показатељи лоше прогнозе и укупног преживљавања пацијенткиња са карциномом грлића.

Adiponectin је протеин који пропада групи адипоцитокина. Секретују га адипоцити и састоји се од 244 аминокиселине. Везивањем за свој рецептор AdipoR1 регулише многе метаболичке процесе, а од скоро је показано његово учешће у настанку и прогресији тумора, ангиогенези и метастазирању. AdipoR1 се може

детектовати и у нормаланом и у малигном ткиву међутим, улога AdipoR1 у карциногенези је контраверзна јер ниво експресије овог рецептора у великој мери варира између различитих карцинома. Са једне стране делује као анти туморски фактор преко проапоптотског, антимигрантног и антипролиферативног својства, док су друге студије показале позитивну корелацију између експресије AdipoR1 и карцинома бубрега, панкреаса, једњака, колона и дојке. Показано је и да adiponectin промовише лимфангиогенезу кроз експресију и секрецију VEGF-C у ћелијама хуманог хондросаркома. Међутим, улога Adiponectina у лимфангиогенези код карцинома грлића није прецизно дефинисана.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Експресија испитиваних маркера рефлектује динамику односа између домаћина и тумора, тако да њихова примена може користити, самостално или у комбинацији са другим тестовима, као индикатор прогнозе болести. Уколико би претпоставке о повезаности тумора и испитиваних маркера биле статистички значајне, било би могуће брже и једноставније пратити еволуцију болести код сваке пацијеткиње као и индивидуализован приступ у даљој дијагностици и лечењу.

Циљ студије

1. **Основни циљ** истраживања је испитати однос експресије маркера: VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1 у различитим степенима карциногенезе.

У складу са основним циљем експериментални задаци су следећи:

1. У свакој од подгрупа стадијума карциногенезе: L-SIL, H-SIL, Ca invasivum анализирати међусобни однос експресије маркера: VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1.
2. Испитати динамику промена експресије сваког маркера: VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1 кроз стадијуме карциногенезе.

Основне хипотезе студије:

Очекује се да је појединачна и комбинована експресија тумор маркера VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1 у позитивној корелацији са клиничким и хистопатолошким степеном напредовања премалигне у малигну лезију

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањем

Метастазирање карцинома представља сложен процес који се састоји од низа фенотипских и биохемијских промена као што су ангиогенеза, лимфангиогенеза, промена генске експресије, покретљивости и облика ћелија. Захваћеност лимфних чворова представља најјачи прогностички фактор у различитим хуманим малигнитетима укључујући карцином грлића. Клиничке студије су показале да је експресија VEGF-C блиско повезана са инвазивним фенотипом карцинома и да утиче на преживљавање пацијената оболелих од карцинома грлића. У досадашњој литератури показана је значајна корелација између експресије VEGF-C у туморским ћелијама и нивоа експресије Prox-1 код лимфних ћелија позитивних на Prox-1. Показано је и да adiponectin промовише лимфангиогенезу кроз експресију и секрецију VEGF-C у ћелијама хуманог хондросаркома, међутим, улога adiponectina у лимфангиогенези код карцинома грлића није прецизно дефинисана. Овом студијом испитаће се однос експресије маркера: VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1 у различитим степенима карциногенезе као и динамика промена експресије сваког маркера: VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1 кроз стадијуме карциногенезе.

2.7. Методе истраживања

2.7.1 Врста студије:

1. Експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*
2. Клиничка експериментална студија (контролисана, отворена)

Материјал и методе

Овом проспективном, клиничко-експерименталном студијом биће обухваћене пацијенткиње у репродуктивном периоду које ће након суспектног цитолошког налаза цервикалног бриса долазити у Гинеколошко акушерску клинику КЦ Крагујевац и по протоколу бити подвргнуте следећем степену дијагностике тј. биопсији грлића. На основу патохистолошког налаза биоптата пацијенткиње ће бити подељене у три групе на основу степена премалигне односно присуства малигне промене: L-SIL, H-SIL, *Ca invasivum*. Код све три групе ће имунохистохемијски бити анализирана експресија маркера: VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1 (рецептор за Adiponectin). Епидемиолошки и клинички подаци ће бити прикупљени анамнестички и увидом у протоколе испитиваних пацијената.

Одређивање нивоа експресије VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1 обавиће се имунохистохемијском техником на парафинским исечцима. Ткива ће бити рутински фиксирана у формалдехиду, дехидрирана градираним алкохолом, 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, ткивни исечци ће бити потапани у ксилол и у опадајућим концентрацијама алкохола (100%, 96%, 70% и 50%). У циљу демаскирања антигена исечци ће бити третиран 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. Анализа ће бити обављена применом палете моноклоналних и поликлоналних антитела према препорученим протоколима (хумано-VEGF-C антитело, моноклонално хумано антитело D2-40, хумано Prox-1 антитело и поликлонално хумано AdipoR1 антитело). Затим ће се за њихову детекцију користити ABC систем. Ткивни пресеци ће се анализирати конвенционалним микроскопирањем.

Микроскопска евалуација експресије биће семиквантитативна, а према препорукама за сваки маркер и на основу добијених вредности тачака раздвајања (cut off point).

Сва имунохистохемијска бојења биће изведена уз контролу квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контрола према пропозицијама UK NEQAS (UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry).

Микроскопска анализа тумора и оцењивање експресије маркера вршиће се на микроскопу типа Carl Zeiss, Axioscop 40. Препарати са репрезентативним пољимасликама ће се коришћењем три микроскопска увећања (x10, x20, x40), помоћу камере AxioCam ICcl.

2.7.2. Популација која се истражује:

Овом студијом ће бити обухваћене репродуктивно активне пацијенткиње у које ће у једногодишњем периоду након суспектног цитолошког налаза цервикалног бриса долазити у Гинеколошко акушерску клинику КЦ Крагујевац и по протоколу бити подвргнуте следећем степену дијагностике тј. биопсији грлића материце.

2.7.3. Узорковање:

На основу патохистолошког налаза биоптата пацијенткиње ће бити разврстане у три групе на основу степена присутне премалигне односно малигне промене (1- присутна дисплазија ниског степена - L-SIL, 2- присутна дисплазија средњег и тешког

степен укључујући и *carcinom in situ* - H-SIL, 3-присутна узнапредовала малигна промена – *carcinoma invasivum*. Проспективно ће бити анализиран једногодишњи период. У студију неће бити укључене пацијенткиње које анамнестички наводе да болују од неке друге болести.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији:

Зависне варијабле: степен експресије испитиваних маркера VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1

Независне варијабле: степен премалигне односно малигне лезије.

Збуњујуће варијабле: старост пацијенткиња, средина из које пацијенткиња долази (урбана или рурална), број порођаја.

2.7.5. Снага студије и величине узорка:

Помоћу рачунарског програма G*Power за планиране тестове извршене су априорне анализе ради утврђивања потребне величине узорка. За све статистичке тестове спроведене током истраживања грешка прве врсте (α) биће 0,05, док ће се захтевати снага теста (β) од 0,8 (80%). У складу са тим и увидом у постојећу релевантну литературу одређен је обим узорка од 90 пацијенткиња.

2.7.6. Статистичка обрада података:

У статистичкој анализи биће коришћене дескриптивне и аналитичке статистичке методе. Од дескриптивних, биће коришћени апсолутне и релативне фреквенције, мере централне тенденције (аритметичка средина, медијана, мод) и мере одсупања (стандардна девијација, интервал варијације). Од аналитичких статистичких метода за проверу постојања разлика биће коришћени одговарајући параметарски и непараметарски тестови, а биће испитивано и постојање корелације (Pearson Correlation коефицијент и Spearman's rho) између посматраних обележја. Од параметарских тестова биће коришћени *T* тест и ANOVA анализа (анализа варијансе). Од непараметарских тестова биће коришћени *Hi*-квадрат тест, *Mann-Whitney U* тест, *Kruskal-Wallis* тест. Такође ће се користити и мултиваријантна бинарна логистичка регресија. За сваки појединачни маркер одређиваће се *cut-off*, сензитивност и специфичност.

Сви резултати биће обрађени помоћу софтверског пакета SPSS 20.0. Грешка прве врсте за сваки од спроведених тестова биће 0,05, тј. ниво значајности је 0,05.

2.8. Очекивани резултати студије

Очекујемо да ће експресија Prox-1 и AdipoR1 бити у позитивној корелацији са порастом густине лимфних судова. Очекујемо и да adiponectin подстиче лимфангиогенезу кроз експресију и секрецију VEGF-C у ћелијама карцинома грлића.

На основу добијених резултата имунохистохемијских испитивања и клиничко морфолошких карактеристика код испитиваних пацијенткиња очекујемо да ће постојати корелација која ће бити релевантна и моћи да се искористи у будућем клиничком праћењу сваке пацијенткиње са премалигном лезијом код које је неопходно даље интензивно праћење промена на ткиву цервикса и евентуалног предвиђања прогресије болести или искључивања из групе пацијенткиња које захтевају интензивније праћење и инвазивну дијагностику.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Метастазирање карцинома представља сложен процес који се састоји од низа фенотипских и биохемијских промена као што су ангиогенеза, лимфангиогенеза, промена генске експресије, покретљивости и облика ћелија. Лимфангиогенеза је процес формирања нових лимфних судова de novo или из већ постојећих. Интратуморска лимфатична ендотелна ћелија је показала способност пролиферације што је указало на процес неолимфангиогенезе. Основни циљ истраживања је испитати однос експресије маркера: VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1 у различитим степенима карциногенезе.

Одређивање нивоа експресије VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1 обавиће се имунохистохемијском техником на парафинским исечцима. Очекује се да ће експресија Prox-1 и AdipoR1 бити у позитивној корелацији са порастом густине лимфних судова као и да adiponectin подстиче лимфангиогенезу кроз експресију и секрецију VEGF-C у ћелијама карцинома грлића. Добijени резултати имунохистохемијских испитивања могли би да се искористе у будућем клиничком праћењу сваке пацијенткиње са премалигном лезијом код које је неопходно даље интензивно праћење промена на ткиву цервикса и евентуалног предвиђања прогресије болести или искључивања из групе пацијенткиња које захтевају интензивније праћење и инвазивну дијагностику.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже проф. др Јанко Ђурић, редовни професор на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство. 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. Kastratović T, Arsenijević S, Matović Z, Mitrović M, Nikolić I, Milosavljević Z, Protrka Z, Šorak M, Đurić J. Methotrexate and myotrexate induce apoptosis in human myoma fibroblasts (T hES cell line) via mitochondrial pathway. *Acta Pol Pharm.* 2015; 72(3):455-64.
2. Mitrovic SLj, Arsenijevic PS, Kljakic D, Djuric JM, Milosavljevic MZ, Protrka ZM, Vojinovic RH. Gestational choriocarcinoma of the cervix. *Arch Iran Med.* 2014; 17(11):783-5.
3. Protrka Z, Arsenijević S, Arsenijević P, Mitrović S, Stanković V, Milosavljević M, Nedović J, Kastratović T, **Durić J.** Prognostic significance of co-overexpression of bcl-2 and c-erbB-2/neu in uterine cervix carcinomas and premalignant lesions. *Med Glas (Zenica).* 2012; 9(2):248-55.
4. Protrka Z, Arsenijevic S, Dimitrijevic A, Mitrovic S, Stankovic V, Milosavljevic M, Kastratovic T, **Djuric J.** Co-overexpression of bcl-2 and c-myc in uterine cervix carcinomas and premalignant lesions. *Eur J Histochem.* 2011; 55(1):e8.
5. Zivanović A, Dimitrijević A, Kastratović T, **Djurić J,** Stanković V, Tanasković I. Ovarian endometroid adenocarcinoma in pregnancy. *Vojnosanit Pregl.* 2011; 68(2):181-4.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Онкологија

5. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Зоран Протрка, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, 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 Ана Митровић Јовановић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, члан.

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

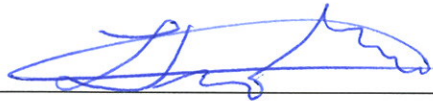
На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Неде Арсенијевић, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.

Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита значај експресије маркера: VEGF-C, Podoplanin (D2-40), Prox-1 и AdipoR1 у различитим степенима карциногенезе као и прогресију карцинома грлића.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др Неде Арсенијевић са називом „Експресија VEGF-C, D2-40, Prox-1 и AdipoR1 у различитим стадијумима карцинома грлића материце“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

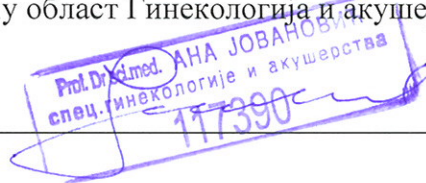
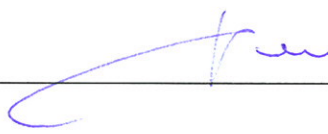
1. **Проф. др Зоран Протрка**, ванредни професор на Факултету медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство,
председник



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



3. **Проф. др Ана Митровић Јовановић**, ванредни професор Медицинског факултета
Универзитета у Београду за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан.



У Крагујевцу 28.07.2017. године