

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

ПРЕДСЕДНИК	16.10.17
Сектор	11989/2-2
Број	11989/2-2
Вредност	

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-713/24 од 13.07.2017. године именована је Комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Стевана Матић, под називом:

„Утицај експресије нестина на пролиферацију и неангиогенезу у глиобластома мултиформе“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Снежана Јанчић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Патолошка анатомија*, председник;

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

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

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

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

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

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Стеван Матић рођен је 12.07.1976. године у Крагујевцу, Република Србија. Средњу школу завршио је у Тополи. Медицински факултет у Крагујевцу уписао је школске 1996/1997. године, а звање доктора медицине стекао је јуна 2016. године. Током студија радио је као демонстратор у току две школске године на предмету Патолошка анатомија. Запослен је у Клиничком центру Крагујевац, као лекар специјалиста Патолошке анатомије. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписао је школске 2010/2011. године – изборно подручје Онкологија. Све испите предвиђене планом и програмом студија положио је са просечном оценом 8,00 Усмени докторски испит положио је фебруара 2014. године са оценом 8 (осам). Специјалистички испит из Патолошке анатомије положио је септембра 2015. За сарадника у настави за ужу научну област Патологија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу изабран је 2010. године. Од маја 2014. до јула 2017. године радио је као асистент за ужу научну област Патолошка анатомија.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске дисертације

Наслов: „Утицај експресије нестина на пролиферацију и неоангиогенезу у глиобластома мултиформе“.

Предмет: У овој студији би се испитивао утицај експресије нестина на пролиферацију и неоангиогенезу у глиобластома мултиформе. Пролиферативни потенцијал би се испитивао на основу експресије антигена Ki67 за кога се зна да је експримиран у ћелији током свих активних фаза циклуса. Индекс неоангиогенезе, односно микроваскуларна густина у туморској и перитуморској строми би се испитивала на основу експресије CD34.

Хипотезе:

1. Повишена експресија нестина је у позитивној корелацији са повишеном експресијом Ki67, односно повишена експресија нестина је у позитивној корелацији са пролиферативним индексом.
2. Повишена експресија нестина је у позитивној корелацији са повишеном експресијом VEGF и CD34, односно повишена експресија нестина је у позитивној корелацији са индексом неоангиогенезе.
3. Експресија нестина је у позитивној корелацији са експресијом HIF1 α .

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

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

Matic SD, Rakocevic MS, Jovic TT, Todorovic MS, Vuckovic LM, Jancic SA, Knezevic MG. Clinical significance of microvessel density and proliferation in prostate cancer core biopsy. J BUON. 2017; 22(3): 757-765. **M23**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Глиобластома мултиформе (астроцитоме С30 градус IV) чини око 10-15% интракранијалних неоплазми и 60-75% астроцитних тумора мозга. Око 90% глиобластома настаје *de novo* (примарни глиобластоми), а око 10% су секундарне неоплазме које настају експанзијом агресивног клона ћелија из дифузног астроцитоме (С30 градус 2) или из анапластичног астроцитоме (С30 градус 3). Глиобластоми се хистопатолошки карактеришу целуларним полиморфизмом, нуклеарном атипичношћу, израженом митотском активношћу, васкуларним тромбозама, микроваскуларном пролиферацијом и некрозом.

Појава која привлачи пажњу и заједничка је многим глиобластомима је микроваскуларна хиперплазија за коју се сматра да је изазвана паракриним деловањем митогена туморског порекла, попут VEGF и PDGF. У последњој деценији су се појавили бројни докази који указују да је експресија нестина у васкуларним ендотелним ћелијама повезана са пролиферацијом и ангиогенезом.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије:

Истраживање ће испитати употребу нестина као клинички релевантног предиктивног маркера за пацијенте са глиобластомом мултиформе, што пружа могућност његовог коришћења као терапеутског циља и индивидуализације антитуморског третмана.

Циљеви студије:

1. Испитивање дистрибуције глиобластома мултиформе у односу на демографске карактеристике испитаника (старост и пол).
2. Анализа глиобластома мултиформе у односу на локализацију.
3. Диференцијација глиобластома мултиформе у односу на инвазију околног паренхима, гломерулоидне пролиферације крвних судова, број митоза и на присуство палисадних некроза.
4. Имунохистохемијско испитивање експресије нестина у глиобластома мултиформе.
5. Имунохистохемијско испитивање експресије Ki67, VEGF, CD34 и HIF1 α и корелација ових вредности са експресијом нестина.

6. Корелација експресије нестина, Ki67, VEGF, CD34 и HIF1 α са класичним прогностичким параметрима (из горе наведених тачака 1,2,3).

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Нестин је интермедијални филаментни протеин класе VI и експримиран је у многим врстама ћелија укључујући ћелије неуралног гребена и прекурсорске ћелије скелетних мишића. Нестин је велики протеин који садржи више од 1600 аминокиселина и првобитно је означен као маркер неуралне стем ћелије. Код одраслих је присутан у можданом ткиву само у реактивним стањима као што је глијални ожиљак настао након траума CNS или у реактивним астроцитима код можданих абсцеса. Експресија нестина је детектована у пролиферишућим ендотелним прогенитор ћелијама, али није нађена у зрелим ендотелним ћелијама. Истраживања спроведена последњих неколико година су показала повећану експресију нестина у ангиосаркому, хемангиобласту и гастроинтестиналним стромалним туморима при чему је истакнуто да је његова експресија у позитивној корелацији са стадијумом тумора. Такође је показано да је експресија нестина у корелацији са хистолошким градусом малигних тумора као што је то случај код глиома, меланома, рабдомиосаркома, стромалог тумора тестиса и тумора надбубрежних жлезда. *Sal* и сарадници су надавно известили о значајно већим серумским нивоима нестина у болесница са малигним туморима јајника у односу на оне са бенигним оваријалним неоплазмама.

Прецизна функција нестина није сасвим расветљена будући да још увек није јасно да ли је нестин само маркер дедиференцијације тумора или има и специфичну биолошку функцију. Постоје студије које сугеришу да нестин може имати улогу у контроли ћелијске пролиферације и диференцијације. У другим извештајима је запажена повезаност експресије нестина са смањеном укупном стопом преживљавања у пацијената са можданим глиомима.

С обзиром да у литератури нема података о утицају нестина на експресију HIF1 α у глиобласту мултиформе, то би се испитивањем корелације између ова два маркера одговорило на питање да ли нестин учествује у регулацији ангиогенезе преко транскрипционг фактора HIF1 α . Након анализе добијених резултата би, надовезујући се на предходна истраживања, покушали да сагледамо место и значај експресије нестина у патогенези и еволуцији глиобластома мултиформе.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Планирана је клиничка експериментална, контролисана, рандомизирана, отворена студија.

2.7.2. Популација која се истражује

Истраживањем би били обухваћени консекутивно оперисани пацијенти са глиобластомом мултиформе и са астроцитомом (СЗО градус II и III) у Служби за неурохирургију КБЦ Земун. Из групе оперисаних са глиобластомом мултиформе најмлађи пацијент у време операције имао 20 год, док је најстарији пацијент из ове групе имао 73 год. Сви испитаници су са територије Републике Србије.

2.7.3. Узорковање

Узорковање би се урадило случајним избором пацијената лечених у од 2006. до 2009. године. За истраживање би се користио оперативни биопсијски материјал укалупљен у парафинске блокове и архивиран у Служби за клиничку патологију КБЦ Земун. На основу рутинских хистопатолошких извештаја би формирали експерименталну групу коју би чиниле оперативне биопсије глиобластома мултиформе (n=56). Контролну групу би чиниле оперативне биопсије астроцитома СЗО градус 2 и/или градус 3 (n=18).

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

- Рутинска Хематоксилин-Еозин метода на основу које би добили информације о инвазији околног паренхима, присуству гломерулоидних пролиферација крвних судова, броју митоза и присуству палисадних некроза
- Имунохистохемијска АВС метода са анти-нестин, анти Ki67, анти VEGF анти CD34 и анти HIF1 α антителима

Извођење методе

Репрезентативни ткивни исечци пренети на Superfrost+ предметна стакла ће најпре бити депарафинисани кроз серију ксилола (4 пута по 5 минута), рехидратисани у серији алкохола опадајуће концентрације (3 пута по 5 минута), а затим ће се радити демаскирање антигена у цитратном пуферу рН 6,0, у микроталасној пећници. Након испирања у фосфатном пуферу (PBS рН 7,49), уследило би блокирање ендogene пероксидазе у трајању од 20мин у 3% раствору водоник пероксида (H_2O_2). Затим би следило испирање у PBS-у, а потом инкубација преко ноћи на 4°C са примарним антителима у влажној комори. Обележени антигени би након испирања били инкубирани са биотинисаним секундарним антителом (Vectastain Elite АВС кит) 1 сат на собној температури. Ово биотинисано антитело реагује са авидинским молекулима коњугованим са пероксидазом. Након испирања у PBS-у, уследила би визуализација помоћу diaminobenzidine-tetrahydrochloride-a (DAB), који ће маркирати места антиген-антитело реакције браон бојом, а затим ће се радити контрастно бојење Mayer-овим хематоксилином.

Као позитвне контроле ће се користити узорци инвазивног карциноми дојке, који су раније вишеструко тестирани и сигурно садрже испитиване антигене. Као негативна ткивна контрола ће се користити узорци ткива третираног неимуном серумом.

Вредновање резултата:

За евалуацију експресије нестина, Ki67, CD34 и HIF1 α позитивних ћелија по јединици површине у мм² ће се користити многонаменски тест систем M42 по Weibel-у. Објективним микрометром (Reichert Wien mm/200) калибрисан је тест систем на микроскопу Olympus BH-2, на увећању 400 (10 окулар x 40 објектив), при чему је одређено мерно поље од 0,016 мм². За испитивање густине позитивних ћелија/мм² ће се бројати сукцесивно по 10 „врхних тачака“. Апсолутна вредност густине позитивних ћелија у „врхној тачки“ ће се одређивати стереометријски. Аритметичка средина добијених вредности „врхних тачака“ представља коначан број позитивних ћелија у мм² за случај. Затим ће бити одређена медијана и испитаници ће се поделити 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). Из апсолутно одређених вредности експресије маркера у односу на одступање од медијане добиће се индекс експресије Нестина, индекс пролиферације, индекс ангиогенезе и индекс експресије HIF1 α .

Експресија VEGF ће бити евалуирана на следећи начин: 0, < 5% позитивних туморских ћелија; 1+, 6-30% позитивних туморских ћелија; 2+ ,31-50% позитивних туморских ћелија; више од 50% позитивних туморских ћелија.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле:

- Пол и старост пацијента
- Локализација тумора
- Инвазија околног паренхима
- Присуство гломерулоидних пролиферација крвних судова
- Број митоза и
- Присуство палисадних некроза

Зависне варијабле:

- Експресија нестина
- Експресија Ki67
- Експресија VEGF
- Експресија Експресија CD34 / Микроваскуларна густина (MVD)
- Експресија HIF1 α .

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Величина узорка одређена је на основу претходних истраживања, а складу са примарном хипотезом. Почетни параметри за одређивање величина група били су: снага студије $1-\beta=0,8$, вероватноћа грешке првог типа $\alpha= 0,05$ и однос броја испитаника по групама 1:4, што је у складу са очекиваном инциденцом патохистолошких типова, за Chi-squared тест. Коришћењем одговарајућег рачунарског програма (G*Power software 3.2.1¹) за Chi-squared тест у облику таблица контингенције израчуната је укупна величина узорка од 74 испитаника и то њих 18 са астроцитомима и 56 са глиобластомом мултиформе.

2.7.6. Статистичка обрада података

Подаци ће бити описани дескриптивним статистичким методама и анализирани методама за процену повезаности (коэффициент корелације), односно регресионим моделима (бинарна логистичка регресија) и методама за анализу разлике (χ^2 и Fisherovim тестом тачне вероватноће). Од дескриптивних статистичких метода користиће се показатељи структуре (исказани у процентима), мере централне тенденције (аритметичка средина, медијана) и мере варијабилитета (стандардна девијација, интервал варијације, интерквartilни опсег, минимална и максимална вредност). Нормалност расподеле тестираће се графичким (хистограм, Q-Q графикон, и детрендовани Q-Q графикон) и рачунским методама (показатељи асиметрије и спљоштености, Kolmogorov-Smirnov тест). Јачина и смер повезаности између датих варијабли израчунаваће се помоћу Pearsonovog, односно Spearman's коефицијента корелације, а облик уз помоћ бинарне логистичке регресије. Ризик би се оцењивао помоћу величине OR (odds ratio), са 95% интервалом поверења. Тестирање значајности разлике учесталости категоријалних података вршиће се помоћу χ^2 теста, у виду таблица контингенције, односно Fischerovog теста тачне вероватноће у случајевима малих учесталости.

Резултати ће бити приказани у виду табела и графикона. У приказу резултата ће бити наведене вероватноће (p), а значајним ће се сматрати вредности $p \leq 0,05$. Подаци ће бити обрађени у SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 19.0 програму.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

1. Очекујемо да се овим истраживањем утврди повезаност експресије нестина са пролиферативним индексом, са експресијом VEGF, индексом неоангиогенезе са експресијом HIF1 α .
2. Очекујемо да ће се експресија нестина показати као добар маркер дедиференцијације и више агресивног фенотипа глиобластома мултиформе.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Глиобластома мултиформе (ГБМ) је најчешћи агресивни тумор мозга са карактеристичном микроваскуларном хиперплазијом која је у директној вези са инвазијом и лошом прогнозом. Обзиром на ретке студије које указују на повезаност експресије нестина са преживљавањем пацијената са ГБМ, наш циљ рада је испитивање утицаја експресије нестина на секрецију транскрипционог фактора HIF1 α , неоангиогенезу и пролиферацију у глиобластома мултиформе.

За истраживање би био коришћен оперативни материјал укалупљен у парафинске блокове и архивиран у Служби за клиничку патологију КБЦ Земун. Експерименталну групу би чиниле оперативне биопсије глиобластома мултиформе (n=56), а контролну групу (n=18) биопсије астроцитоме (гр 2 и/или гр.3). На пресецима дебљине 3-4 μ би се примениле рутинска HE и имунохистохемијска ABC метода са анти-нестин, анти Ki67, анти VEGF, анти CD34 и анти HIF1 α антителима. За сваки појединачан случај би били одређени уобичајени прогностички параметри: инвазија околног паренхима, гломерулоиднепролиферације крвних судова, број митоза и присуство палисадних некроза. Након анализе експресије наведених маркера добијене вредности би се користиле за испитивање утицаја експресије нестина у односу на секрецију HIF1 α , микроваскуларну густину, индекс пролиферације, као и у односу на класичне клиничко-морфолошке прогностичке параметре ГБМ. Подаци ће бити обрађени у SPSS програму верзија 19.0.

Очекујемо да се утврди позитивна корелација експресије нестина са испитиваним фактором транскрипције, про-ангиогеним и пролиферативним антигенима, као и са густином микроциркулације у глиобластома мултиформе.

Истраживање ће омогућити употребу нестина као клинички релевантног предиктивног параметра за пацијенте са глиобластомом мултиформе, што пружа могућност његовог коришћења као терапијског циља .

3. Предлог ментора:

Комисија за ментора предлаже **Проф. Др Сању Миленковић**, ванредног професора за ужу научну област Патологија и Орална 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. Zivković N, Berisavac I, Marković M, **Milenković S**. Falx chondroma with hyperostosis of the skull: a case report. *Srp Arh Celok Lek*. 2014; 142(7-8): 464-7.
2. Markovic M, Antunovic V, **Milenkovic S**, Zivkovic N. Prognostic value of peritumoral edema and angiogenesis in intracranial meningioma surgery. *J BUON*. 2013; 18(2): 430-6.
3. Macvanski M, Ristić-Balos D, Vasić B, Lavrnić S, Gavrilović S, Milićević M, **Milenković S**, Stosić-Opinčal T. Intracranial yolk sac tumor in an adult patient: MRI, diffusion-weighted imaging and 1H MR spectroscopy features. *Vojnosanit Pregl*. 2012; 69(3): 277-80.
4. **Milenković S**, Marinkovic T, Jovanovic MB, Djuricic S, Berisavac II, Berisavac I. Cyclin D1 immunoreactivity in meningiomas. *Cell Mol Neurobiol*. 2008; 28(6): 907-13.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Онкологија.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Снежана Јанчић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Патолошка анатомија*, председник;

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

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

Закључак и предлог Комисије

На основу увида у досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др **Стевана Матића** Комисија закључује да кандидат испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.

Комисија сматра да ће предложена докторска тема др **Стевана Матића** бити од великог научног и практичног значаја, тиме што ће омогућити употребу нестина као релевантног предиктивног маркера за пацијенте са глиобластомом мултиформе

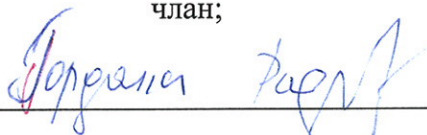
Комисија предлаже Наставно научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др **Стевана Матића** под називом: „Утицај експресије Нестина на пролиферацију и неоангиогенезу у глиобластома мултиформе“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

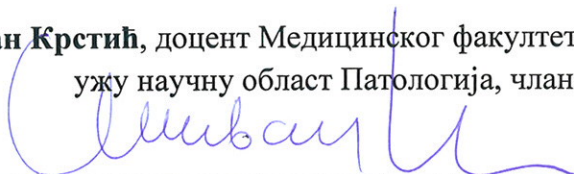
1. Проф. др Снежана Јанчић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, председник



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



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



У Крагујевцу, 23.08.2017. године