

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
КРАГУЈЕВАЦ**

**1. Одлука Наставно – научног већа**

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, број **01-646/3-2** од 28.01.2015. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Зоране Вукашиновић Бокун, под називом:

**„Прогностички значај имунохистохемијске анализе пролиферације, апоптозе, адхезивности и неоангиогенезе код менингеома различитог градуса“**

На основу одлуке Већа, предложена Комисија у саставу:

- 1. Проф. др Ирена Танасковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, председник
- 2. Доц. др Слободанка Митровић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан
- 3. Доц. др Миљан Крстић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

Подноси Наставно-научном већу Факултета следећи:

**2. Извештај Комисије о подобности теме**

**2.1 Биографија Кандидата**

Др Зорана Вукашиновић Бокун је рођена у Београду, 18.06.1976. Основну школу је завршила у Риму, Италија. Трећу београдску гимназију је завршила 1995. Дипломирала је на Медицинском факултету Универзитета у Београду 2004. године, са просечном оценом 8,86. Стручни испит за лекаре положила је 2005. године.

У октобру 2006. године запослила се у Служби за патологију Клиничко-болничког центра Звездара у Београду. Одбранила је магистарску тезу из Форензичке патологије 03.07.2008. године, а у октобру исте године је уписала специјализацију из Патолошке анатомије на Институту за патологију Медицинског факултета Универзитета у Београду. У априлу 2010. запослила се у Служби за клиничку патологију Клиничко-болничког центра Земун.

Специјалистички испит из Патолошке анатомије др Вукашиновић Бокун положила је 24.10.2013. године. Од октобра 2010. године учествује у одржавању вежби и активностима везаним за израду семинарских радова као сарадник наставника на предмету Патологија са патофизиологијом на Високој здравствено-санитарној школи струковних студија „Висан“.

У мају 2012. године др Бокун учествовала је на курсу из цитологије у организацији Европске федерације цитолошких удружења (5<sup>th</sup> EFCS Tutorial) у Трондхајму, Норвешка, као и на међународним и националним скуповима и конгресима. Од 30.09.2014. изабрана је за предавача на Високој здравственој школи струковних студија у Београду на предметима Патолошка хистологија и Цитологија.

Члан је Удружења патолога и цитолога Србије и Европског удружења патолога. Живи у Београду, удата је и има двоје деце.

## **2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације**

### **Наслов:**

**„Прогностички значај имунохистохемијске анализе пролиферације, апоптозе, адхезивности и неоангиогенезе код менингеома различитог градуса“**

### **Предмет:**

Предмет ове студије је анализа прогностичког значаја имунохистохемијске експресије *E-Cadherin-a*, *CD44*, *Bax-a*, *Survivin-a*, *CD31*, *cMyc* и *Ki67* у ткиву менингеома различитог градуса и различитог хистолошког типа, као и испитивање корелације експресије *E-Cadherin-a*, *CD44*, *Bax-a*, *Survivin-a*, *CD31*, *cMyc* и *Ki67* са класичним прогностичким параметрима у менинеомима (пол, старост, локализација и величина тумора, степен хистолошке диференцијације, стадијум по TNM класификацији), који су од значаја за туморску прогнозу .

### **Хипотеза:**

Претпоставља се да су повишене експресије *Ki67*, *Bax-a*, *Survivin-a* и *CD31* и снижена експресија *cMyc* у позитивној корелацији са агресивним биолошким понашањем менингеома. Такође се претпоставља да су повишене експресије *Ki67*, *Bax-a*, *Survivin-a* и *CD31* у негативној корелацији са нивоима експресије *E Cadherin-a* и *cMyc*. Претпоставка је и да је снижена експресија *E Cadherin-a* и *CD44* у позитивној корелацији са агресивним биолошким потенцијалом менингеома.

## **2.3.Подобност кандидата**

Кандидат је објавила рад у часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе:

1.Vukasinovic Bokun Z, Berisavac I, Benovic R, Lavrinic M. Immunoexpression of Cathepsin D in primary and recidivant meningeomas. *Materia Medica*, 2012; 28(1):397-404 (M52=1,5 бода).

## **2.4. Преглед стања у подручју истраживања**

И поред бројних доступних резултата истраживања који се односе на имунохистохемијске карактеристике менингиома, још увек не постоји стандардни панел маркера за процену биолошког понашања и прогресију ове врсте тумора. Бројне студије приказују различите резултате у погледу експресије појединих антигена и њиховог значаја за даљи ток болести, али у вези са тим још увек постоје бројне дилеме. На пример, из литературних података није јасно да ли експресија *E-Cadherin*-а може корелирати са СЗО градусом менингиома или хистолошким типом тумора. У студији Fingarelle Branger и сарадника испитиван је однос интегрина и маркера ћелијске адхезивности CD44, и установљена је појачана експресија CD44 код менинготелијалних и транзиционалних менингиома, док су друге студије утврдиле присуство експресије E Cadherin-а код ових хистолошких типова менингиома.

У литератури су, такође, оскудни и подаци који говоре о односу маркера пролиферације cMyc протоонкогена и Ki67, али се већина аутора слаже да је њихова експресија код бенигних, атипичних и анапластичних менингиома у обрнутој корелацији. До сада није утврђена нити семиквантитативно дефинисана експресија ових маркера код различитих хистолошких типова менингиома као ни код рекурентних и рецидивантних менингеалних тумора.

## **2.5. Значај и циљ истраживања**

### **А. Значај истраживања**

1. На основу добијених резултата би било могуће издвојити групе болесника са агресивним биолошким понашањем тумора и болеснике са повишеним ризиком за настанак рецидива.

2. Употреба наведеног панела антитета пружа могућност диференцирања маркера за процену биолошког потенцијала нискоградусних менингиома.

### **Б. Циљеви**

1. Испитивање дистрибуције менингеома у односу на демографске карактеристике испитаника (старост и пол)

2. Анализа хистолошких типова и СЗО градуса менингеома у односу на анатомску локализацију

3. Утврђивање хистолошког типа и градуса менингеома према важећим критеријумима Светске здравствене организације

4. Испитивање имуноекспресије *E-cadherina*, CD44, *Vax-a*, *Survivin-a*, CD31, cMyc и Ki67 код различитих хистолошких типова менингеома, као и испитивање статистичке значајности ових резултата у односу на хистолошки тип и градус менингеома.

5. Испитивање корелације експресије *E-cadherina*, CD44, *Vax-a*, *Survivin-a*, CD31, cMyc и Ki67 са класичним прогностичким параметрима.

6. Унапређење панела маркера пролиферације, апоптозе и ћелијске адхезивности за рутинску употребу у циљу процене биолошког потенцијала нискоградусних менингеома.

## 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Познато је да се хируршка интервенција сматра куративном код бенигну менингиома (СЗО градус 2), док се радио- и хемотерапија користе након хистолошке дијагнозе атипичног или малигног менингиома (СЗО градус 2 и 3) или у случајевима иноперабилних тумора.

У рутинској пракси патолога који дијагностикује менингиоме, од изузетног је значаја процена очекиваног биолошког понашања сваког од ових тумора због одговарајућег третмана болесника. С обзиром на различите начине праћења и лечења пацијената са бенигну, атипичним и малигну менингиома, одређивање биолошког профила сваког тумора је од кључног значаја клиничарима у даљем планирању третмана.

Један од циљева ове студије био би утврђивање имунохистохемијске експресије *E-Cadherin-a* и CD44 код различитих менингиома (хистолошки типови, градус тумора и рецидивирање). Познато је да поремећаји регулације апоптозе представљају један од кључних фактора канцерогенезе и играју одређену улогу и у прогресији менингиома. Однос апоптотског регулатора *Vax-a*, са недавно откривеним инхибитором апоптозе *Survivin*-ом могао би допринети диференцијацији оних менингиома, који, иако хистолошки бенигни имају потенцијал за агресивно биолошко понашање

Познато је такође да неоваскуларизација представља процес стварања нових крвних судова из већ постојећих. Кључна је за туморски раст, инвазивност и способност метастазирања многих солидних тумора, па тако и менингиома. Мерење броја новостворених крвних судова може да се врши помоћу детекције микроваскуларне густине (енгл. *Microvascular Density* – MVD) између осталих, обележавањем крвних судова анти-CD31 антителима. Ћелијски адхезиони молекул CD31 или PECAM-1 (енгл. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* – PECAM-1) има кључну улогу како у интеракцији између ендотелних ћелија и полиморфонуклеарних леукоцита и лимфоцита, тако и између ендотелних ћелија током неоангиогенезе. Оно што је значајно за ово истраживање је да се вредност микроваскуларне густине мења са градусом менингиома и да је она већа код атипичних и рецидивантних менингиома у односу на менингиоме градуса I СЗО.

С обзиром на чињеницу да у вези са предметом истраживања планираног у овој студији постоје оскудни и контрадикторни подаци, добијени резултати унапредили би могућност процене рекуренције и појаве биолошки агресивнијег тумора у релапсу, као и процену ризика од настанка рецидива и могућег биолошког понашања таквог тумора.

Испитивањем присуства експресије имуномаркера обухваћених овом студијом, било би могуће утврдити који од наведених маркера пролиферације, апоптозе и ћелијске адхезивности и инвазивности би могао наћи своје место у свакодневном раду неуропатолога, као и који од њих има прогностички значај када се ради о процени агресивности и могућности рецидивирања хистолошки бенигнух тумора.

## 2.7. Методе истраживања

За истраживање ће се користити оперативни материјал болесника оперисаних од менингеома, обрађен стандардном патохистолошким методом обраде. Узорци ће бити фиксирани током 24 часа на собној температури у 10% неутралном пуферисаном формалину. Након фиксације, ткиво ће бити дехидратисано у аутоматском ткивном процесору (*Leica TP 1020*) у серији алкохола растуће концентрације, затим обрађено ксилолом у два наврата и два пута растопљеним парафином (*Paraffin non caking 57-60%*, Merck Co. No. 107158). Узорци ће бити укалупљени на апарату за калупљење (*Leica EG 1150C*) и сечени на микротому.

Хистолошки препарати дебљине 4 микрона биће наносени на предметна стакла. Затим ће ткивни пресеци бити обојени стандардном ХЕ методом и анализирани на светлосном микроскопу *Leica* под стандардним увеличањима. Сваки узорак биће обојен рутинском методом, анализиран, а резултат ће бити забележен фотомикрографијом. Хистолошка дијагноза, градус тумора и хистолошки тип, биће постављена на основу критеријума WHO из 2000. године.

За потребе имунохистохемијског испитивања биће коришћени анти-*Survivin* антитело (*Survivin, Lab Vision*), анти-*Bax* антитело (*Bax, Lab Vision*), анти-Е Кадхерин антитело (*E-Cadherin, Lab Vision*), анти-CD44 антитело (*CD44, Lab Vision*), анти-CD31 антитело (*CD31, Dako*), анти-*cMyc* антитело (*cMyc, Lab Vision*), и анти-Ки67 антитело (*Ki67, Dako*).

За потребе имунохистохемијске анализе, стандардно обрађени и укалупљени ткивни пресеци дебљине 4 микрона биће монтирани на предметна стакла (*Superfrost Microscope slides Menzel-Glaser NOJ 1800 AMNZ*). Након сушења у термостату и хлађењу на собној температури, ткивни пресеци ће бити депарафинисани ксилолом у три наврата по 5 минута, рехидратисани у алкохолима опадајућих концентрација и дестилованој води. Демаскирање антигена извршиће се загревањем у комерцијалном раствору (*Target Retrieval Solution –DAKO*) у микроталасној пећници 10 минута на 850 вати без достизања тачке кључања воде.

Имунохистохемијска метода LSAB+/HRP (*Labeled Streptavidin-Biotin Horsho Redish Peroxidasa K0675 DAKO Cytomation*) биће започета блокирањем ендogene пероксидазе

помоћу 3% водоник пероксида у влажној комори. Ткивни пресеци биће инкубирани најпре са примарним антителом у трајању од 10 до 30 минута у влажној комори, а затим и са секундарним антителом обележеним биотином (*Biotinylated-link DakoCytomation K0675*). Након испирања, следи инкубација са пероксидазом обележеним стрептавидином (*Streptavidin – HRP Dako Cytomation K0675*), а затим наношење раствора супстрат-хромоген (DAB, *DakoCytomation K3468*) на собној температури током 10 минута. Мајеров хематоксилин биће коришћен за контрастирање једара. После испирања текућом водом и дехидрацијом кроз алкоhole растуће концентрације и ксилолом, пресеци ће бити покривени покровним стаклима са DPX-ом.

Позитивна контрола представљаће присуство уобичајених ткивних и ћелијских структура која се боје датим антителима у одсуству патолошких промена док ће се за утврђивање негативне контроле изоставити примарно антитело и нотирати резултат.

Имуноекспресија антитела која ће бити испитана нотираће се семиквантитативно и квантитативно у зависности од локализације и врсте антигена који се детектује (+ присутна имунореактивност, - одсуство имунореактивности).

Ткивна експресија *E-Cadherin*-а и CD44 биће изражена семиквантитативно у три степена: слаба, умерена и јака експресија (мембранско и цитоплазматско бојење) .

За процену микроваскуларне густине биће изабрана три поља на предметном стаклу бојеном ХЕ методом величине 1mm<sup>2</sup> која ће бити прегледана на увеличању 40x. Затим ће иста поља бити испитана на ткивним пресецима бојеним анти-CD31 антителом. Микроваскуларна густина биће одређивана методом *Weidner*.

Нуклеарна или цитоплазматска имунореактивност у случајевима испитивања реактивности на *Survivin* биће изражена семиквантитативно на тај начин што ће бити изабрано најмање пет поља великог увеличања за сваки хистолошки пресек. Бојење на датим пољима ће се сматрати позитивним уколико најмање 30% ћелија буде показивало цитоплазматску позитивност, а најмање 15% ћелија нуклеарну позитивност. Проенти позитивности ће бити изражени као средња вредност са свих пет поља великог увеличања.

Ткивна експресија Ки67 антитела ће бити сматрана позитивном уколико се уочи јасно нуклеарно бојење. Место најјаче експресије овог маркера пролиферације биће установљено скринирањем ткивних пресека на увеличању x4 идентификацијом највеће густине позитивности (*hot spot*). У овим тачкама ће се испитати јачина експресије бројањем позитивних ћелија на 1000 ћелија на највећем увеличању стандардног лабораторијског микроскопа. Добијена вредност ће бити изражена у процентима. Експресија наведених маркера ће бити евалуирана од стране два истраживача.

## **А. Врста студије**

Клиничко-експериментална ретроспективна студија

## **Б. Популација која се испитује**

У истраживање ће бити укључени пацијенти оба пола и свих узрасних група, оперисани на Клиници за Неурохирургију Клиничко- болничког центра Земун у периоду од 01.01.2013. године до 31.12.2014. године. Пацијенти који ће бити обухваћени овим истраживањем су углавном са територије Републике Србије.

## **В. Узорковање**

Узорковање би се вршило насумични (проста рандомизација) одабиром пацијената оперисаних због менингеома, у периоду од 01.06.2013. до 31.12.2014. У овом истраживању би се користио биопсијски, оперативни материјал, који је укалупљен у парафинске блокове и архивиран у Служби за патологију КЦ Земун.

На основу стандардних патохистолошких извештаја, из тог периода, биће формирана експериментална група коју би чиниле оперативне биопсије менингеома (n = 103) из оперативног препарата достављеног Служби за патологију.

## **Г. Варијабле истраживања**

Независне варијабле:

- пол
- године живота
- СЗО градус тумора
- хистолошки тип тумора
- локализација тумора
- рецидив

Зависне варијабле:

- експресија ћелијских адхезионих молекула E Cadherin-a и CD44,
- експресија апоптотских маркера Бах-a и Survivin-a,
- експресија маркера неонагиогенезе (CD31),
- експресија маркера пролиферације Ки67 и cMyc.

## **Д. Снага студије и величина узорка**

Студијски узорак израчунат је узимајући у обзир инциденцу менингиома од 6 случајева на 100000 становника. Узимајући у обзир величину целокупне популације (N=7199077 становника у Србији према подацима Института за јавно здравље др Милан Јовановић

Батут) , интервала поузданости од 95% и прецизности оцене од 1,5%, потребно је укључити најмање 103 пацијента са менингиомом. Величина група у студији одређена је програмом Java Applets for Power and Sample Size.

## **Ђ.Статистичка анализа података**

Демографски подаци биће анализирани дескриптивном статистичком анализом. Груписање података биће извршено према демографским карактеристикама испитаника, док ће врсте менингиома бити груписане према анатомској локализацији и градусима СЗО.

За анализу зависности између варијабли биће коришћени параметарски односно непараметарски тестови у зависности од типа расподеле података. Корелационом и регресионом анализом биће анализирана зависност између нумеричких варијабли. За испитивање постојања разлике у средњим вредностима између варијабли испитаника груписаних према неком од критеријума биће коришћен т тест или Mann Whitney U-test (за две групе података) или ANOVA/ANCOVA (за две или више група података). Односи између номиналних варијабли биће тестирани Chi-square тестом. Ниво значајности биће одређен за  $p < 0.05$ . Резултати тестова биће приказани графички и табеларно.

## **2.8. Очекивани резултати докторске дисертације**

На основу добијених резултата моћи ће да се:

1. Утврди постојање ризичне групе менингиома за настанак рецидива.
2. Издвоје групе тумора са агресивним биолошким понашањем.
3. Издиференцирају маркера за процену биолошког потенцијала нискоградусних менингиома.

## **2.9. Оквирни садржај дисертације**

Менигиоми су спорорастући, углавном бенигни тумори који чине 10-20% свих примарних интракранијалних тумора. Потичу од ћелија арахноидалне капе. Већином су бенигни, али постоје менигиоми који се по свом хистолошком и имуохистохемијском профилу сврставају у атипичне и малигне, па је циљ ове проспективне студије да се утврди имуохистохемијски профил примарних интракранијалних менингиома, одређивањем експресије ћелијског адхезионог молекула E Cadherin-a и CD44, маркера апоптозе *Bax*-a и *Survivin*-a, маркера неоангиогенезе CD31 и маркера пролиферације Ki67 и cMyc, као и да се испита потенцијални утицај ових карактеристика на процену биолошког понашања тумора.

За истраживање ће се користити оперативни материјал 103 болесника оперисаних због менингеома на Клиници за Неурохирургију Клиничко-болничког центра Земун. Узорци добијени хируршком ресекцијом биће обрађени стандардном Н/Е методом, као и



имунохистохемијском LSAB+/HRP техником, за утврђивање присуства следећих антигена: Ki67, cMyc, *E-Cadherin*, CD44, *Bax*, *Survivin* и CD31. За сваки тумор биће одређени СЗО градус, митотски индекс и имунохистохемијска експресија наведених маркера која ће се евалуирати семиквантитативно. Добијени резултати ће бити адекватно статистички обрађени.

Одређивањем митотског индекса испитаће се веза између пролиферативног потенцијала менингиома и њихове агресивности док би експресија *Bax*-а и *Survivin*-а указала на алтерације апоптотских механизма код ових тумора. Снижен ниво и/или изостанак експресије *E-Cadherin*-а и CD44 би значио смањење или губитак ћелијске кохезивности, што би указало на потенцијалну агресивност менингеома.

Очекује се повећање микроваскуларне густине детектоване анти-CD31 антителом код атипичних и рецидивантних менингиома у односу на менингиомае градуса 1 и 2 по СЗО-у, а корелативном анализом испитиваних имуномаркера са хистопатолошким параметрима менингеома ће бити могуће проценити биолошко понашање тумора. Имунохистохемијско испитивање менингеома може користити и за примену евентуалне циљане терапије код атипичних, а посебно код малигних менингеома.

## **2.10. Предлог ментора**

За ментора дисертације Комисија предлаже проф. др Сању Миленковић, ванредног професора Стоматолошког факултета Универзитета Привредна академија у Новом Саду, за ужу научну област Патолошка анатомија.

## **2.11. Научна област дисертације**

Медицина. Уже области: Онкологија и Патологија

## **2.12. Научна област чланова Комисије:**

**1. Проф. др Ирена Танасковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, председник

**2. Доц. др Слободанка Митровић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

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

## **Закључак и предлог Комисије**

На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих резултата, кандидат др Зорана Вукашиновић Бокун испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Студија би била оригинално научно дело, којом очекујемо да се утврди хистолошки тип и градус менингеома према важећим критеријумима Светске здравствене организације и да се издиференцира панел имуномаркера пролиферације, апоптозе и ћелијске адхезивности за рутинску употребу у циљу процене биолошког потенцијала нискоградусних менингеома.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације др Зоране Вукашиновић Бокун под називом: **„Прогностички значај имунохистохемијске анализе пролиферације, апоптозе, адхезивности и неоангиогенезе код менингеома различитог градуса“** и одобри њену израду

### **Комисија:**

- 1. проф. др Ирена Танасковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, председник

---

- 2. доц. др Слободанка Митровић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

---

- 3. доц. др Миљан Крстић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

---

У Крагујевцу,

