

ОБРАЗАЦ 6

13.06.2024

ПРИМЛ. БРОЈ			
Орг. јед.	бр. зб.	број одл.	број лист.
05	6422		

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ФАКУЛТЕТА МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

и

ВЕЋУ ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ

УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу одржаној 20.11.2023. године (број одлуке: 01-11416/12-13) одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом: „Прогностички значај експресије VEGF, BCL2 и сурвивина код узрапредовалог неситноћелијског карцинома плућа“, кандидата Марине Марковић, студента докторских академских студија медицине, за коју је именован ментор др Марина Петровић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина.

На основу података којима располажемо достављамо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

О ОЦЕНИ УРАЂЕНЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Подаци о докторској дисертацији
1.1. Наслов докторске дисертације:
„Прогностички значај експресије VEGF, BCL2 и сурвивина код узрапредовалог неситноћелијског карцинома плућа“
1.2. Опис докторске дисертације (навести кратак садржај са назнаком броја страница, поглавља, слика, шема, графикана, једначина и референци) (до 500 карактера):
Докторска дисертација кандидата Марине Марковић написана је на 101 страници, садржи 6 поглавља (увод, циљ истраживања, материјал и методе, резултати, дискусија, закључак, литература), 26 табела, 6 слика, 52 фигуре, 279 библиографских података наведених по Ванкуверским правилима.
1.3. Опис предмета истраживања (до 500 карактера):
Упркос бројним дијагностичким и терапијским достигнућима, карцином плућа и даље представља малигнитет са највишом стопом смртности широм света. Преко 80% свих неситноћелијских карцинома плућа (енгл: <i>non small cell lung cancer-NSCLC</i>) се открива у локално узрапредовалом IIIВ или метастатском IVA или IVB клиничком стадијуму болести, са петогодишњим преживљавањем од 1-5%. Многе студије су покушале да идентификују довољно снажне клиничке показатеље који би могли да предвиде одговор на примењено лечење и исход болесника са карциномом плућа. Претпоставка модерног доба истраживања је да се исход

различитим биолошким маркерима.

Ангиогенеза је есенцијална је за раст и развој ткива уопште. Малигна прогресија солидних тумора такође зависи од патолошке неоангиогенезе а фактор раста васкуларног ендотела (енгл: *Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF*) је кључни медијатор овог процеса. Истраживања су показала да експресија сурвивина у туморским ћелијама доводи до ослобађања VEGF чиме је индукована ангиогенеза и на тај начин доказана позитивна корелација експресије сурвивина и PI3K/Akt повећане експресије β -Катенин-Tcf/Lef што последично доводи до секреције VEGF и ангиогенезе. Са друге стране, битна карактеристика малигне трансформације - индукције и прогресије тумора, управо је блокирање апоптозе чиме се продужава живот ћелије. Молекул *bcl-2* (енгл: *B cell lymphoma gen 2*) је први откривени онкопротеин који игра кључну улогу у апоптози, делујући као инхибитор овог процеса.

И поред великог броја студија, резултати у многим студијама су контрадикторни, тако да утицај експресије VEGF, *bcl-2*, сурвивина на преживљавање болесника са неситноћелијским карциномом плућа јесте и даље актуелна тема. Ова теза треба да разлучи у којој мери ткивна експресија VEGF, *bcl-2* и сурвивина утиче на терапијски одговор и прогнозу болесника са узрапредовалим неситноћелијским карциномом плућа.

1.4.Анализа испуњености полазних хипотеза:

Хипотезе истраживања су:

1. Експресија VEGF, *bcl-2* и сурвивина код узрапредовалог неситноћелијског карцинома плућа се разликује у односу на хистолошки тип;
2. Експресија VEGF, *bcl-2* и сурвивина код узрапредовалог неситноћелијског карцинома плућа у корелацији је са једногодишњим и двогодишњим преживљавањем.

1.5.Анализа примењених метода истраживања:

Комплетно испитивање је било спроведено у Центру за онкологију, Служби за патолошко-анатомску дијагностику и Клиници за плућне болести Универзитетског Клиничког центра Крагујевац, у периоду од 2017. до 2020.године. протокол истраживања је одобрио Етички одбор Универзитетског Клиничког центра Крагујевац, одлуком број 01-12751/2016. Пацијенти су за своје учешће у истраживању дали писани информисани пристанак, након детаљних студијских информација. Протокол је спроведен у складу са важећом регулативом Добре клиничке праксе (енгл. Good Clinical Practice, GCP) и Хелсиншке декларације (енгл. The World Medical Association (WMA), Declaration of Helsinki). Планирано је испитивање 216 болесника са патохистолошки потврђеним NSCLC (аденокарцином, сквамозелуларни карцином, аденосквамозни карцином), који према TNM класификацији припада нересектабилном (IIIa, IIIb и IV стадијуму).

Сви испитаници су били груписани у две групе:

1. Група А: IIIa + IIIb стадијум – пацијенти који су били лечени комбинованом хемио и зрачном терапијом, односно биолошком терапијом;
2. Група Б: IV стадијум- који су били лечени хемотерапијом +/- палијативном радиотерапијом, односно биолошком терапијом.

У овом истраживању су коришћени узорци ткива добијени бронхоскопијом и VATS хирургијом. Као метод су коришћени стандардни, хистоморфолошки Х&Е метод и имунохистохемија. Из Историја болести су преузети лични и демографски подаци пацијената (пол, старост, занимање, навике, коморбидитети, породична анамнеза и тд.), резултати радиолошке дијагностике, подаци о примењеним протоколима лечења, као и резултати EGFR анализе добијени PCR методом у локалним референтним лабораторијама.

На рутински, Н&Е обојеним препаратима узорака тумора, микроскопском анализом су

На рутински, Н&Е обојеним препаратима узорака тумора, микроскопском анализом су одређивани класични параметри NSCLC: хистолошки тип, хистолошки и нуклеарни градус, митотски индекс, степен некрозе и стромалне-моноклеарне реакције.

Пресеци ткива дебљине 3 микрона, претходно фиксираног 24 сата у 10% неутралном, пуферизованом формалину и укалупљеног у парафинске блокове су монтирани на високо адхерентне плочице, депарафинисани и рехидратисани. Након ослобађања епитопа и блокирања ендогене пероксидазе, препарати ткива су инкубирани са примарним мишјим моноклонским антителима VEGF (клон ВГ1; разблажење 1:100) и Bcl-2 (клон 100/D5, разблажење 1:50), након испирања и са секундарним антителом, на собној температури према препорукама произвођача (ThermoFisher Scientific, USA). Реакција је визуализована 3,3-диаминобензидин-тетрахлоридом (DAB), контрастирање Мајеровим хематоксилином, а финално монтирање и препокривање плочица Canada балсамом. Квалитет имунохистохемијске реакције је праћен истовременим тестирањем унутрашњих и спољашњих, негативних и позитивних ткивних контрола.

Припремљени имунохистохемијски препарати су анализирани под светлосним микроскопом (Axioskop 40, Carl Zeiss, Germany), а репрезентативна поља сликана дигиталном камером (AxioCam ICc1, Carl Zeiss, Germany). Сва имунохистохемијска бојења су изведена уз спољашњу контролу квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контрола према пропозицијама NordiQC (Nordic Immunohistochemical Quality Control)

Имунохистохемијску анализу су изводила независно два истраживача, без упознавања са клиничким подацима испитиване популације. Код препарата са различито добијеним вредностима, коначан резултат је потигнут консензусом.

Цитоплазматска експресија VEGF је одређивана семиквантитативним методом, као производ процента позитивних туморских ћелија и интензитета реакције, према препорукама Клеина и сарадника. Процентуална експресија тј. број VEGF позитивних на 100 избројаних туморских ћелија је сврставана у 4 категорије: 0 - одсуство имунореактивности, 1 <30%, 2- 31--60% и 3 >61% имунореактивности, док је интензитет бојења градиран као: 0- одсуство бојења, 1- слабо; 2 – средње и 3- јако бојење. Множењем ових вредности VEGF експресија у свим узорцима NSCLC је скорована од 1 до 9. Дефинисана је гранична вредност (cut off) на основу које су тумори подељени на оне са ниском и високом VEGF експресијом.

Експресија Bcl-2 је одређивана као проценат позитивних туморских ћелија, не узимајући у обзир интензитет реакције. Као позитивни NSCLC тумори дефинисани се они у којима $\geq 10\%$ ћелија експримира Bcl-2 маркер.

Пролиферациони индекс тумора је одређиван као број једара која експримирају Ki-67 на 100 избројаних туморских ћелија тј. изражаван је процентом. На основу добијених вредности, сви NSCLC су сврставани у две групе, оне са ниским пролиферативним индексом, код којих је Ki-67 био мањи од 30% и групу NSCLC са високим Ki-67 индексом (већим од 30%).

Иницијални одговор на спроведено лечење процењиван је након другог и након четвртог циклуса хемиотерапије, на основу радиографски детектованих туморских лезија, компјутеризоване томографије грудног коша, контролног ендоскопског налаза, ехосонографског прегледа абдомена и других промена:

1. Комплетан одговор (Complete Response - CR): потпуно ишчезавање клинички мерљиве болести за период од најмање 4 недеље.
2. Парцијални одговор (Partial Response – PR): смањење мерљивих лезија за најмање 30% у највећем дијаметру и без појаве нових за 4 недеље.
3. Прогресија болести (Progressive Disease – PD): прогресија постојећих промена за 20% у мерљивој величини, појава нових или поновна појава раније ишчезлих промена.
4. Стабилна болест (Stable Disease – SD): је одређена када не постоје јасни критеријуми да се болест одреди као комплетан или парцијални одговор, односно прогресија болести.

1.6. Анализа испуњености циља истраживања:

Циљеви студије су били:

1. Испитати експресију VEGF, bcl-2 и сурвивина у исечку туморског ткива NSCLC добијеног бронхоскопијом
2. Анализирати корелацију експресије VEGF, bcl-2 и сурвивина у NSCLC са патохистолошких параметрима тумора (хистолошки тип, хистолошки градус, митотски индекс)
3. Анализирати однос експресије VEGF, bcl-2 и сурвивина у NSCLC са клиничким параметрима испитиваних болесника (старост, пол, TNM стадијум болести, локализација метастаза)
4. Испитати корелацију експресије VEGF, bcl-2 и сурвивина у NSCLC са одговором на примењене протоколе лечења
5. Утврдити стопу преживљавања испитиваних болесника након две године праћења и њену повезаност са експресијом VEGF, bcl-2 и сурвивина у NSCLC.

1.7. Анализа добијених резултата истраживања и списак објављених научних радова кандидата из докторске дисертације (аутори, наслов рада, волумен, година објављивања, странице од-до, DOI број¹, категорија):

Најважнији резултати докторске дисертације били су следећи:

1. Имунореактивност за Bcl-2 доказана имунохистохемијском методом постоји код 41,4% NSCLC.
2. Експресија Bcl-2 позитивних туморских ћелија статистички значајно се разликује према хистолошком облику NSCLC.
 - а) сквамозелуларни карциноми показују већу експресију Bcl-2 (51,0%), у односу на аденокарциноме (34,8%).
 - б) експресија Bcl-2 позитивних туморских ћелија већа је у туморима са вишим хистолошким градусом
 - в) експресија Bcl-2 позитивних туморских ћелија је повезана са слабом стромалном моноклеарном реакцијом.
3. Експресија Bcl-2 позитивних туморских ћелија није била повезана са полом, пушачким статусом, Т и Н дескриптором као ни са стадијумом болести.
4. Експресија Bcl-2 је у негативној корелацији са високим индексом пролиферације Ki67 код аденокарцинома.
5. Виши ниво експресије Bcl-2 позитивних туморских ћелија био је заступљен код пацијената који су имали коморбидитете на плућима.
6. Постоји значајна повезаност између Bcl-2 позитивних туморских ћелија и преживљавања болесника са узнапредовалим NSCLC.
 - а) двогодишње преживљавање било је статистички значајно дуже у групи пацијената са аденокарциномом плућа и Bcl-2 позитивним туморским ћелијама у односу на сквамозелуларни карцином са Bcl-2 позитивним туморским ћелијама.
7. Имунореактивност за VEGF доказана имунохистохемијском методом постоји код 71,8% NSCLC.
8. Експресија VEGF позитивних туморских ћелија статистички значајно се разликује према хистолошком подтипу NSCLC, аденокарциноми показују већу експресију VEGF (82,2%), у односу на сквамозелуларне карциноме плућа (56,0%).

¹ Уколико публикација нема DOI број уписати ISSN и ISBN

9. Експресија VEGF је била повезана са хистолошким типом, хистолошким градусом, Т и Н дескриптором.

10. Постоји значајна повезаност VEGF експресије и присуства метастаза у централном нервном систему, значајно већа VEGF експресија је показана код пацијената који су имали метастазе у централном нервном систему у односу на оне код којих метастазе нису постојале.

11. Постоји значајна повезаност између експресија VEGF и преживљавања пацијената у стадијуму IV NSCLC.

12. Експресија VEGF је повезана са применом анти-ангиогеног агенса у терапијском протоколу, додавање антиангиогеног агенса хемиотерапијском дублету довело је до продужења PFS i OS код пацијената са аденокарциномом плућа.

13. Постоји негативна корелација између експресије VEGF и Bcl-2 експресије.

14. Експресија VEGF је у позитивној корелацији са пролиферативним индексом Ki67.

15. Експресија сурвивина није показала статистичку значајност у односу на испитиване клиничкопатолошке карактеристике NSCLC-а.

Радови:

1. Markovic M, Mitrovic S, Dagovic A, Jovanovic D, Nikolic T, Ivosevic A, et al. Does the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Bcl-2 Have a Prognostic Significance in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer? Healthc. 2023; 11(3). M22 IF 3.160 (2021)

1.8. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области и анализа извештаја о провери докторске дисертације на плагијаризам (до 1000 карактера):

Прегледом латературе и увидом у биомедицинске базе података „PubMed“, „Medline“, „KOBSON“, „SCIndeks“, уз коришћење одговарајућих кључних речи: немикроцелуларни карцином плућа, сурвивин, VEGF, BCL2 нису пронађене студије сличног дизајна. Извештај о плагијаризму показао је минималан степен преклапања и то искључиво на местима која су била неопходна, односно, као последица навођења имена институција, методологије која је слична методологији коришћеној у сличним истраживањима, општих стручних имена, фраза и података, као и библиографских података о коришћеној литератури.

Сходно наведеном, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Марине Марковић под називом „Прогностички значај експресије VEGF, BCL2 и сурвивина код узнапредовалог неситноћелијског карцинома плућа“ представља резултат оригиналног научног рада.

1.9. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области:

Добијени резултати истраживања могу бити од великог значаја за процену терапијског одговора и прогнозу болесника са одмаклим стадијумом неситноћелијског карцинома плућа. С обзиром да је неситноћелијски карцином плућа, тумор са непредвидивим понашањем у погледу терапијског одговора и прогнозе, значај истраживања је да се поред стандардних клиничких параметара, испитивани туморски маркери искористе као предиктори терапијског одговора и прогнозе код болесника са овим малигнитетом.

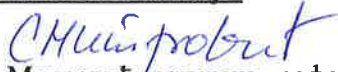
1.10. Оцена испуњености услова за одбрану докторске дисертације у складу са студијским програмом, општим актом факултета и општим актом Универзитета (до 1000 карактера):

Комисија сматра да су испуњени сви услови за одбрану ове докторске дисертације у складу са студијским програмом, општим актима Факултета медицинских наука и општим актима Универзитета у Крагујевцу.

2. ЗАКЉУЧАК

На основу анализе докторске дисертације и приложене документације Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом „Прогностички значај експресије VEGF, BCL2 и сурвивина код узрапредовалог неситноћелијског карцинома плућа“, кандидата **Марине Марковић**, предлаже надлежним стручним органима да се докторска дисертација прихвати и да се одобри њена одбрана.

Чланови комисије:


Слободанка Митровић, редовни професор

Факултет медицинских наука

Универзитет у Крагујевцу

Председник комисије


Александар Даговић, доцент

Факултет медицинских наука

Универзитет у Крагујевцу

Члан комисије

Раде Милић, доцент

Војномедицинска академија

Универзитет одбране у Београду

Члан комисије

