

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-2873/3-6 од 06.04.2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Оливере Лончаревић под називом:

„Експресија туморских маркера, појава рецидива и стопа петогодишњег преживљавања хируршки лечених пацијената са неситноћелијским карциномом плућа”

Чланови комисије су:

1. **проф. др Зорица Лазић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник
2. **проф. др Ивана Станковић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Интерна медицина, члан
3. **доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан

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

ИЗВЕШТАЈ

2. Извештај комисије о оцени научне засноваости теме докторске дисертације

Кандидат др Оливера Лончаревић испуњава све формалне услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за пријаву докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Оливера Лончаревић, специјалиста за плућне болести и туберкулозу, рођена је 05.09.1971. год. у Лозници, где је завршила основну школу и гимназију. Дипломирала је на Медицинском факултету Универзитета у Београду 2007. године, а специјализацију из

пнеумофтизиологије завршила је 2003. на Војномедицинској Академији са одличним успехом. Од тада ради као лекар - специјалиста у Клиници за плућне болести ВМА.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, уписала је 2009/10. године, а усмени докторски испит положила је 2013. године са оценом 10. Члан је Европског респираторног удружења (ЕРС). Учествовала је на бројним домаћим и међународним научним скуповима и објавила је више научних радова.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов:

„Експресија туморских маркера, појава рецидива и стопа петогодишњег преживљавања хируршки лечених пацијената са неситноћелијским карциномом плућа”

Предмет:

Испитивање утицаја експресије туморских маркера на појаву локалних и удаљених рецидива, као и повезаност са петогодишњом стопом преживљавања код болесника са неситноћелијским карциномом плућа (NSCLC).

Хипотезе:

- Постоји корелација патохистолошких и имунохистохемијских налаза исечака туморског ткива добијеног радикалном операцијом NSCLC
- Постоји корелација стопе петогодишњег преживљавања, односно времена до појаве рецидива болести, са патохистолошким и имунохистохемијским налазом исечака туморског ткива добијеног радикалном операцијом NSCLC
- Могући предиктори рецидива NSCLC су патохистолошки тип тумора и имунохистохемијски налаз
- Могући предиктори рецидива NSCLC су нивои експресије туморских маркера (HER-2, bcl-2, CD-31, p-63, металопотеиназа)
- Постоји корелација нивоа експресије туморских маркера (HER-2, bcl-2, CD-31, p-63, металопотеиназа) са појавом рецидива NSCLC и стопом петогодишњег преживљавања

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио један рад у целини као први аутор на енглеском језику категорије M23, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

1. **Lončarević O, Rusović S, Stojsavljević M, Plavec G, Aćimović S, Cvetković G, Vuković J, Petrović M.** Hereditary hemorrhagic teleangiectasia with bilateral pulmonary vascular malformations – case report. *Vojnosanit Pregl.* 2016;73(10): In press.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Карцином плућа је водећи узрок смрти широм света међу болесницима са малигним обољењима. Процењено је да је 2012. године било 1.800.000 ново-дијагностикованих пацијената са карциномом плућа (12,9% од свих малигнитета), док је 1.590.000 умрло (19,4% од свих малигнитета). Карцином плућа је најчешћи карцином код мушкараца (1.200.000 или 16,7% од свих малигнитета), док је код жена на четвртом месту по учесталости.

Малигни тумори плућа се патохистолошки класификују на две велике групе: тумори епитела и тумори мезотела. Малигни епителни тумори се деле према Светској здравственој организацији на микроцелуларне, сквамозелуларне, аденокарциноме, крупноћелијске карциноме, аденосквамозне, саркоматоидне карциноме, карциноиде, туморе жлезданог ткива и преинванзивне лезије. Сви побројани типови малигнух тумора плућа, сем микроцелуларног карцинома, спадају у групу неситноћелијских карцинома плућа (NSCLC). Неситноћелијски карциноми плућа чине око 80-85% свих карцинома плућа.

По утврђеној дијагнози и прецизној процени раширености болести, болесници се класификују у одређене стадијуме болести, коришћењем TNM система, који се односи на величину тумора (Т 1-4), захваћености лимфних жлезда (Н 1-3) и присуству метастаза (М 0-1), чиме се истовремено одређују терапијски поступци, а такође је значајан и за прогнозу болести. За оболеле од NSCLC у раном стадијуму болести (Стадијуми I до IIIA), хирургија је основни терапијски приступ. Одлука за хирушко лечење карцинома плућа заснива се на клиничкој процени стадијума болести и индикована је као први терапијски приступ, под условом да су испуњени стандардни критеријуми у погледу оперативног ризика у односу на планирани обим ресекције.

Према подацима, које су објавили Пистерс и сарадници очекивано петогодишње преживљавање код радикално оперисаних болесника је 67% у IA клиничком стадијуму, 57% у IB, 55% у IIA, 38,39% у IIB и 23-25% у IIIA клиничком стадијум. Појава локалног рецидива у првих пет година се јавља код 10% у I стадијуму, код 12% у II стадијуму и 15% у IIIA стадијуму болести. Појава удаљеног рецидива се јавља код 15% у IA стадијуму, 30% у IB, код 40% у II стадијуму болести и 60% у IIIA стадијуму.

Додатна примена адјувантне радио- или хемотерапије након ресекције тумора се раније није примењивала, али од пре пар година, адјувантна терапија представља стандард у лечењу болесника са карциномом плућа у II стадијуму, као и оних са ресектабилним карциномом у IIIA стадијума, јер се значајно поправља време до прогресије болести, као и укупно преживљавање.

На основу резултата досадашњих клиничких испитивања, адјувантна хемотерапија се не примењује након комплетне ресекције NSCLC стадијума IA и IB, сем код пацијената с позитивним рубом ресекције (R1 - микроскопски резидуална болест, R2 - макроскопски резидуална болест).

Због свега изнешеног, анализа фактора који утичу на појаву рецидива NSCLC и краће преживљавање има велики значај.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије:

Значај ове студије је у томе што ће на основу имунохистохемијске анализе туморског ткива болесника добијеног радикалном операцијом NSCLC, моћи да предвиди време до појаве рецидива и стопа петогодишњег преживљавања болесника. Ако студија покаже да постоји значајна колерација патохистолошких и имунохистохемијских налаза исечака туморског

тквива оперисаних боелсника са временом до појаве рецидива и стопом петогодишњег преживљавања, биће предложена модификација досадашњих протокола лечења које је до сада било опште прихваћено, а што је и сврха овог истраживања и његов оригиналан научни допринос.

Циљ студије:

Главни циљ ове студије јесте испитати корелацију патохистолошких и имунохистохемијских налаза исечака туморског ткива добијеног радикалном операцијом NSCLC и стопе петогодишњег преживљавања, односно времена до појаве локалног и удаљеног рецидива болести.

У складу са главним циљем, дефинисани су и посебни циљеви:

- Анализирати имунохистохемијске налазе исечака туморског ткива добијеног радикалном операцијом NSCLC у односу на експресију туморских маркера: HER-2, bcl-2, CD-31, p-63 и металопротеиназа.
- Испитати корелацију патохистолошких и имунохистохемијских налаза исечака туморског ткива добијеног радикалном операцијом NSCLC.
- Испитати стопу петогодишњег преживљавања и време до појаве рецидива болести, као и њихову корелацију са патохистолошким и имунохистохемијским налазом исечака туморског ткива добијеног радикалном операцијом NSCLC.
- Анализирати корелацију нивоа експресије испитиваних туморских маркера са појавом рецидива NSCLC и стопом петогодишњег преживљавања ових болесника.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Према подацима, које су објавили Пистерс и сарадници очекивано петогодишње преживљавање код радикално оперисаних болесника је 67% у IA клиничком стадијуму, 57% у IB, 55% у IIA, 38,39% у IIB и 23-25% у IIIA клиничком стадијум. Појава локалног рецидива у првих пет година се јавља код 10% у I стадијуму, код 12% у II стадијуму и 15% у IIIA стадијуму болести. Појава удаљеног рецидива се јавља код 15% у IA стадијуму, 30% у IB, код 40% у II стадијуму болести и 60% у IIIA стадијуму.

На основу резултата досадашњих клиничких испитивања, адјувантна хемиотерапија се не примењује након комплетне ресекције NSCLC стадијума IA и IB, сем код пацијената с позитивним рубом ресекције (R1 - микроскопски резидуална болест, R2 - макроскопски резидуална болест).

Новија истраживања показују да нивои експресије одређених туморских маркера (HER-2, BCL-2, CD-31, p-63, металопротеиназа и других) имају значајан утицај на стопу петогодишњег преживљавања и појаву локалног и удаљеног рецидива болести.

Ванг и сарадници су показали да повишена експресија нивоа металопротеиназе 14 корелира са краћим петогодишњим преживљавањем пацијаната са NSCLC. С друге стране је пак показано да металопротеиназа 9 има значаја код аденокарцинома и да је код њих повезана са лошијим преживљавањем, док код сквамозелуларног карцинома нема неки прогностички значај. Следећи туморски маркер који се показао значајним јесте туморсупресорски ген p-63

чија негативна експресија је повезана са краћим временом до појаве рецидива болести код NSCLC код стадијума I и II који није захватио лимфне нодусе.

Насупрот томе, показано је да прекомерна експресија bcl-2 је повезана са бољом прогнозом болести и бољим преживљавањем. Слично је и са металопротеиназом 2 чија експресија је повезана са бољом прогнозом код карцинома плућа. HER-2 је такође значајан јер његова експресија је повезана такође са лошијим преживљавањем па је код ових болесника потребна агресивнији терапијски приступ. И поред великог броја студија, резултати у многим студијама су контрадикторни, тако да утицај туморских маркера на време до појаве рецидива болести и преживљавање јесте и даље актуелна тема.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

У циљу нашег истраживања спровели би смо клиничку, делом проспективну, делом ретроспективну, опсервациону студију типа серије случаја хируршки лечених пацијената са NSCLC. Ретроспективна анализа би обухватила све социодемографске, клиничке и патохистолошке налазе, док би проспективно била урађена имунохистохемијска анализа и нивои експресије испитиваних туморских маркера из већ постојећег туморског ткива добијеног током операције тумора.

2.7.2. Популација која се истражује

Комплетно испитивање било би спроведено на пацијентима са патохистолошки потврђеним NSCLC, који су на основу одлуке Конзилијума за малигне туморе плућа и плеуре Војномедицинске академије планирани за хируршко лечење. Сви пацијенти који би били укључени у ову студију лече се на Клиници за грудну хирургију, Клиници за пулмологију и у Институту за патологију и судску медицину Војномедицинске академије. Учествовање у студији би подразумевало да пацијенти најпре потпишу пристанак информисаног пацијента, односно овлашћено лице од стране њих ако они нису у стању.

2.7.3. Узорковање

Биће укључени сви оперисани пацијенти са NSCLC у периоду од 2010. године. Они ће бити праћени током петогодишњег периода након ресекције тумора.

Критеријуми за укључивање:

- 1) опште стање пацијента према скали Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (тзв. performans status- PS) 0 и 1;
- 2) ресектабилан NSCLC (I, II и ресектабилни IIIa клинички стадијум према међународној TNM класификацији)
- 3) операбилан NSCLC (у односу на плућну функцију и коморбидитет).

Критеријуми за искључивање:

- 1) други малигнитети

Студија ће обухватити пацијенте који ће бити оперисани због NSCLC на Клиници за грудну хирургију Војномедицинске академије. Узорковање за испитивану групу би се обављало по принципу „згодног“ узорка- уз задовољење критеријума за укључење и искључење у студију.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Подаци ће бити прикупљени на следећи начин: Свим пацијентима ће се пре операције узети анамнеза, урадити физички преглед, лабораторијске анализе (опште хематолошке и биохемијске анализе), електрокардиограм, стандардна постеро-антериорна и профилна радиографија плућа и срца, ехотомографија абдомена, компјутеризована томографија грудног коша и горњег абдомена, бронхоскопија, а по потреби и други расположиви дијагностички поступци у циљу адекватног одређивања стадијума болести (позитронска емисиона томографија, сцинтиграфија костију, компјутеризована томографија или магнетна резонанца централног нервног система, плеурална пункција, пункција перикарда...) у складу са Националним водичем добре клиничке праксе за карцином плућа.

Независне варијабле:

- Социодемографски подаци добијени на основу анамнестичких података (пол, старост).
- Коморбидитетни статус, биће анализиран уколико проузрукује смртни исход током петогодишњег периода праћења ових болесника.
- Патохистолошка анализа тумора (хистолошки тип, величина, хистолошки градус, статус ресекционих маргина, присуство лимфоваскуларне и/или перинеуралне туморске инвазије, патолошки TNM стадијум).
- Хистолошка верификација анализе туморског ткива после операције, обухватила би стандардну методу бојења препарата хематоксилин-еозину, поред хистохемијских бојења која су важан елемент одређивања хистолошког типа и градуса болести. За патохистолошку анализу узорци туморског ткива код свих оперисаних болесника биће фиксирани у 5% пуферисаном, неутралном формалину и обрађени у V.I.P. Сакура апарату за аутоматску фиксацију, дехидратацију и прожимање ткива, а потом укалуљени у парафин
- Имунохистохемијска анализа применила би се демаскирањем епитопа са микроталасним предтретманом у 0,5 M цитратном пуферу рН 6,0. Имунохистохемијске анализе које ће бити примењене вршиће се семиквантитативно на основу процента имунореактивности и сензитивности у ћелијама тумора и пратећој ћелијској популацији и у строми, везивним влакнима, крвним и лимфним судовима, као и перинеуралној инфилтрацији; Све ово би било рађено са дијагностичким и пролиферативним туморским маркерима: HER-2, BCL-2, CD-31, p-63 и металопротеиназама. У имунопатолошкој анализи хирушки ресецираног хуманог материјала применом наведених туморских маркера биће одређено семиквантитативно присуство и број туморских ћелија у перитуморском ткиву; Као примарна антитела била би употребљена антитела фирме Dako cytotation: Моноклонско мишје антихумано bcl-2 антитело, Моноклонско мишје антихумано CD-31 антитело и поликлонско зечје антихумано HER-антитело, p63 и антитела на металопротеиназе; Додатно градирање степена позитивности за све имунохистохемијске анализе ће се вршити семиквантитативно на основу процента имунореактивности у оквиру туморских ћелија и то до 30% (+/1), од 30-60% (+/2), преко 60% (+/3); Одсуство имунореактивности (-/0) ће се такође одређивати у складу са наведеним за свако имунохистохенијско бојење.

Зависне варијабле:

- Стопа петогодишњег преживљавања
- Време до појаве рецидива болести

2.7.5. Снага студије и величина узорка

На основу статистичких параметара (снага студије- 0,80; вероватноћа α грешке- 0,05; двострано тестирање; једнаке величине група) да би се пронашла значајна разлика у експресији металопротеиназе-14 у групи пацијената са NSCLC, при чему је према литератури петогодишње преживљавање пацијената са њиховом високом експресијом било 5,5%, а са ниском експресијом 52,1%, израчуната је потребна величина узорка χ^2 тестом за независне узорке, користећи рачунарски програм G*Power 3.1, од укупно 34 пацијената. Међутим, у студији се планира да се укључи око 80 пацијената.

2.7.6. Статистичка обрада података

Комплетна статистичка анализа података ће бити урађена у статистичком компјутерском програму, PASW Statistics, верзија 18. Све атрибутивне варијабле ће бити представљене у облику фреквенци појединих категорија, а статистичка значајност између појединих категорија ће бити тестирана Хи-квадрат тестом. Све континуалне варијабле ће бити представљене у облику средње вредности \pm стандардне девијације, док ћемо за разлике у континуалним варијаблама користити Студентов t тест за независне или зависне узроке или Ман-Витнијев тест или Вилкоксон тест, у зависности од нормалности расподеле која ће бити проверена на основу Колмогоров-Смирновљевог теста. Веза између потенцијалних фактора ризика и исхода ће бити испитана униваријантном и мултиваријантном логистичком регресијом, и биће изражена као odds ratio са 95% интервалом поверења. Корелација између варијабли ће бити испитана уз помоћ Пирсове или Спирманове корелације, а јачина корелације ће бити процењивана на основу Кохенових критеријума: $r > 0,5$ веома јака корелација; $r 0,3-0,49$ средње јака корелација; $r < 0,29$ слаба корелација. Све анализе ће бити процењене на нивоу статистичке значајности од $p < 0,05$. Након статистичке обраде података резултати ће бити представљени табеларно и графички.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да ћемо наћи значајну корелацију патохистолошких и имунохистохемијских налаза исечака туморског ткива добијеног радикалном операцијом NSCLC и стопе петогодишњег преживљавања, односно времена до појаве рецидива болести. Такође, очекујемо да ће ниво експресије туморских маркера бити значајан предиктор појаве рецидива болести, што значајно скраћује период петогодишњег преживљавања.

Предложена имунохистохемијска анализа туморског ткива болесника имала би значаја у одређивању учесталости постоперативног праћења и модалитета лечења болесника са оперисаним неситноћелијским карцином плућа, што би могло бити искоришћено у модификацији протокола лечења ових болесника.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Главни циљ ове студије јесте испитати корелацију патохистолошких и имунохистохемијских налаза исечака туморског ткива добијеног радикалном операцијом NSCLC и стопе петогодишњег преживљавања, односно времена до појаве локалног и удаљеног рецидива болести. Такође, очекујемо да ће ниво експресије туморских маркера HER-2, BCL-2, CD-31, p-63 и металопротеиназа бити значајан предиктор појаве рецидива болести, што значајно скраћује период петогодишњег преживљавања.

Иако болесници имају исти оперативни стадијум болести и хистопатолошки тип тумора, у многим студијама је показана разлика у стопи петогодишњег преживљавања и периода до појаве рецидива болести. Због тога је циљ ове студије да утврди да ли ниво експресије одређених туморских маркера има утицај на ранију појаву рецидива болести, а сходно томе одредити даљу учеталост праћења и потребу за додатним антитуморским лечењем.

3. Предлог ментора:

За ментора се предлаже **проф. др Марина Петровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина. 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

1. **Petrović M**, Bukumirić Z, Zdravković V, Mitrović S, Atkinson HD, Jurišić V. The prognostic significance of the circulating neuroendocrine markers chromogranin A, pro-gastrin-releasing peptide, and neuron-specific enolase in patients with small-cell lung cancer. *Med Oncol* 2014; 31(2):823-829.
2. **M. Petrović**, S. Mitrovic, V. Stankovic, V. Jurisic, H.D. Atkinson. Neuroendocrine Markers—Useful Predictors of Therapeutic Responses in Non-resectable Non-small Cell Lung Cancer. *LabMedicine* 2012; 43(2):6-10.
3. **Petrović M**, Baskić D, Banković D, Ilić N. Neuroendocrine differentiation as an indicator of chemosensitivity and prognosis in nonsmall cell lung cancer. *Biomarkers* 2011; 6(4):311-320.
4. **M. Petrović**, N. Ilić, O. Lončarević, I. Čekerevac, Z. Lazić, Lj. Novković, V. Ćupurdija, G. Kostić. Risk factors for brain metastases in surgically staged IIIA non-small cell lung cancer patients treated with surgery, radiotherapy and chemotherapy. *VojnosanitPregl* 2011; 68(8):643-649.
5. **M Petrović**, N Ilić, D Baskić. Značaj neuroendokrinih markera u odgovoru na lečenje i preživljavanje bolesnika s odmaklim nesitnoćelijskim karcinomom pluća. *Srp Arh Celok Lek* 2010; 138(1-2):37-42.
6. **Petrović M**, Tomić I, Plavec G, Ilić S, Ilić N, Baskić D. Neuron specific enolase tissue expression as a prognostic factor in advanced non small cell lung cancer. *J BUON* 2008; 13:93-96.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Пулмологија, Онкологија

5. Научна област чланова комисије

1. **проф. др Зорица Лазић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник
2. **проф. др Ивана Станковић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Интерна медицина, члан
3. **доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публикованих радова, комисија закључује да кандидат **др Оливера Лончаревић** поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу, где се испитује значај експресије одређених туморских маркера на стопу петогодишњег преживљавања и појаву локалних и удаљених рецидива болести.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза **др Оливере Лончаревић** бити од великог научног и практичног значаја.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Оливера Лончаревић под називом „**Експресија туморских маркера, појава рецидива и стопа петогодишњег преживљавања хируршки лечених пацијената са неситноћелијским карциномом плућа**” и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

проф. др Зорица Лазић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник

проф. др Ивана Станковић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Интерна медицина, члан

доц. др Иван Јовановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан

у Крагујевцу, 05 .05. 2016.год.