

Оцену готове докторске тезе,
доставља,-

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ
ФАКУЛТЕТА ВОЈНОМЕДИЦИНСКЕ АКАДЕМИЈЕ**

На 32. Седници Наставно-научног већа ВМА, одржаној 24.09.2015.год. одређена је комисија за оцену готове докторске тезе мр сц мед Милене Јовић биох. из Института за патологију и судску медицину ВМА чија тема гласи:

„ПРОЦЕНА БИОЛОШКИХ СВОЈСТАВА ТУМОРА НА ОСНОВУ ПАТОХИСТОЛОШКОГ ТИПА, ИН СИТУ ЕКСПРЕСИЈЕ И СЕРУМСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЈА СУРВИВИНА У БОЛЕСНИКА СА МЕЛАНОМОМ”.

Након увида у достављени материјал и разговора са кандидатом, комисија у саставу:

ВС проф др сц мед **Снежана Церовић**, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; ВС проф др сц мед **Данило Војводић**, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; ван проф др сц **Горан Брајушковић** мол. биол. Биолошки факултет Универзитета у Београду, ппук доц др сц мед **Милош Костов**, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; ВС доц др сц мед **Љиљана Јауковић**, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација је написана на 155 страна и подељена на следећа поглавља: Увод (24 стране), Хипотеза и циљеви истраживања (4 стране), Материјал и методе истраживања (4 стране), Резултати (73 стране), Дискусија (28 страна), Закључци (1 страна) и Литература (16 страна). Резултати су документовани са 70 табела и 71 графикомом. У раду је цитирано 284 рада.

2. Увод, хипотеза и циљеви истраживања

Тема истраживања овог рада се односи на утврђивање повезаности биолошких својстава меланома са локалном и системском експресијом молекула сурвивина и његовим утицајем на прогнозу и ток болести.

У **Уводу** кандидат наводи да лечење пацијената са метастатским меланомом представља велики онколошки проблем због изузетне отпорности ћелија меланома на постојеће видове терапије. Бројне генетске, имунолошке, имунохистохемијске и клиничке студије усмерене су на дефинисање нових биомаркера као позданих показатеља предикције и прогнозе, или на проналажење средстава и/или процедура који би повећали хемосензитивност, индуковали апоптозу и смањили пролиферативни и метастатски потенцијал меланомских ћелија. Последњих година опсежно су испитиване улоге сурвивина у патогенези малигних тумора, првенствено као биомаркера. Новији подаци указују да сурвивин има значајну улогу у настанку и дисеминацији меланома.

Сурвивин је бифункционални протеин који има улогу инхибитора апоптозе, регулатора митозе и ангиогенезе. У физиолошким условима експресија сурвивина је регулисана ћелијским циклусом и везана искључиво за G2M фазу. Сурвивин је присутан у деобном вретену где се везује за тубулин и има улогу регулатора митозе. Иако механизми одговорни за регулацију повећаног испољавања сурвивина током трансформације меланоцита у меланомске ћелије нису до краја познати епигенетски, генетски и пост транслациони механизми за регулацију гена за сурвивин су описани у другим врстама ћелија. Експресија сурвивина је изразито повећана у ткиву већине малигних тумора и феталних хуманих ткива, док је код терминално диференцираних ткива одсутна. Подаци савремених истраживања показују да испољавање сурвивина у ћелијама различитих типова солидних тумора као и хематолошких малигнитета корелира са прогресијом тумора и исходом болести. Показано је да високе концентрације сурвивина у малигним туморима изазивају резистенцију на хемотерапију и јонизујуће зрачење.

Имунохистохемијским студијама је утврђено да је експресија сурвивина у малигним туморима независна од ћелијске пролиферације и митотског индекса и да не рефлектује просто само присуство великог броја пролиферишућих ћелија.

Додатно у ткиву већине малигних тумора, због измењене регулације испољавања гена за сурвивин, повећана је синтеза не само у митози, већ у свим фазама ћелијског циклуса. Улога сурвивина у патогенези канцера није ограничена само на инхибицију апоптозе, јер комплексном регулацијом митотског вретена утиче на хеморезистенцију малигних ћелија, али и на неоангиогенезу околног туморског ендотела. На животињском моделу је показано да је сурвивин повећано испољен у меланомским ћелијама у односу на нормалне меланоците и да је неопходан за вијабилност ћелија меланома, као и да испољавање сурвивина у меланоцитима предиспонира животиње настанку меланома по излагању УВ светлу, као и метастазирању ћелија установљеног тумора. Повећана експресија сурвивина је показана код инвазивних и метастатских меланома и сматра се да је она последица дерегулације апоптозе, митозе и ангиогенезе. DNK микроереј анализом утврђено је да је ген за сурвивин један од четири најзначајнија гена чија је експресија повећана код меланома.

Из свега наведеног кандидаткиња је поставила следеће **хипотезе**:

I Испољавање сурвивина значајно је веће у узорцима туморског ткива болесника са меланомом у односу на пацијенте са бенигним пигментним лезијама коже.

II Испољавање сурвивина значајно је веће у метастатским лезијама у односу на примарне туморске лезије.

III Ткивне и серумске концентрације сурвивина корелирају са клиничким показатељима прогресије болести у болесника са меланомом.

За проверу поставки хипотеза кандидаткиња је дефинисала следеће **циљеве истраживања**:

Одредити концентрацију сурвивина у узорцима серума болесника са меланомом и упоредити просечне концентрације сурвивина у групама дефинисаним према различитим клиничким стадијумима.

Одредити концентрацију сурвивина у серијским узорцима серума појединачних болесника и корелирати их са клиничким стадијумом болести.

Одредити степен експресије сурвивина имунохистохемијски у ткивним узорцима меланомских лезија (узорцима примарног тумора и у метастазама).

За сваког појединачног болесника упоредити налаз испољавања сурвивина у туморском ткиву са серумским концентрацијама. Добијене односе корелирати са клиничким стадијумом болести.

Корелирати *in situ* експресију сурвивина и серумске концентрације сурвивина са патохистолошким показатељима (хистолошки тип, облик ћелија, присуство митоза, степен васкуларне инвазије, степен инфилтрације лимфоцита, присуство микросателитозе, величином тумора, присуством улцерације, присуством регресије, степеном присуства меланофага).

Корелирати *in situ* експресију сурвивина и серумске концентрације сурвивина са дужином временског интервала без метастаза. Корелирати *in situ* експресију сурвивина и серумске концентрације сурвивина са током болести..

3. Кратак опис постигнутих резултата

У поглављу **Материјал и методе истраживања** представљен је дизајн испитивања –тип студије: Проспективно-ретроспективна.

Истраживање је обављено у Институту за патологију и судску медицину, Институту за медицинска истраживања, Клиници за пластичну хирургију и опекотине и Клиници за кожне и полне болести Војномедицинске академије.

Студијом је обухваћено 133 испитаника старости од 20 до 75 година подељених у три групе. Прву групу је чинило 84 пацијената са дијагностикованим кутаним меланомом (23 пацијента у I, 17 у II, 28 у III и 16 у IV клиничком стадијуму болести), другу групу двадесет и пет пацијената са диспластичним невусима и трећу групу двадесет и четири пацијента са бенигним пигментним лезијама. Дијагноза меланома је постављена на основу клиничког и дерматоскопског прегледа дерматовенеролога, прегледа хирурга пластичара и патохистолошке анализе пигментне промене, а клинички стадијум болести је утврђен на основу стандарних процедура за меланом (лабораторијске анализе укључујући LDH, Rtg плућа и срца, ултразвучног прегледа врата, аксила, препона, мале карлице и абдомена, а за појединачне пацијенте и СТ главе, грудног коша и мале карлице). Критеријуми за искључивање из студије су били: меланом ока и слузокоже, присуство других малигнитета и трудноћа. У првој групи сваком пацијенту са

сумњивом пигментном лезијом је урађен дермоскопски преглед. Преоперативно су узети узорци крви за одређивање серумских вредности сурвивина. Промене су хируршки одстрањене и патохистолошки верификоване. Класификацијом по Clark-у је одређен ниво инвазије, класификацијом по Breslow-у дебљина промене и TNM класификацијом хистолошки и клинички стадијум болести. Степен експресије сурвивина је утврђен имунохистохемијски у ткивним узорцима хируршких ресектата примарног тумора и метастаза и ELISA тестом у узорцима серума пацијената узоркованих иницијално и након 1, 3, 6 месеци и годину дана након операције примарног тумора.

У **Статистичкој обради података** поред тестирања уобичајених дескриптивних параметара (средња вредност, стандардна девијација, медијана, стандардна грешка, 95% границе поверења и фреквенције појаве обележја), тестирање разлика учињено је коришћењем непараметријских тестова (*Wilcoxon*, *Mann-Whitney*) и једносмерне анализе варијансе (*Anova test* са *Bonferroni* пост тестирањем). Значајност, смер и интезитет међусобних условљености тестирани су применом *Spearman* корелационе анализе. Минимална статистичка значајност утврђена је на нивоу $p < 0.05$. Статистичке анализе учињене су коришћењем GraphPad Prism софтвера верзије 5.0.

Добијени **резултати** су показали да су ткивна експресија сурвивина узорака примарног тумора болесника са меланомом и серумска концентрација сурвивина значајно повећане у односу на узорке особа са диспластичним невусима и бенигним пигментним лезијама. Испољавање сурвивина није значајно веће у метастатским лезијама у односу на примарне туморске лезије али се вредности степена ткивне експресије сурвивина у примарном тумору болесника са и без метастатске болести значајно разликују, веће су у групи са метастатском болести. Ткивна експресија сурвивина најинтензивнија је у III клиничком стадијуму болести а најмања у почетном I клиничком стадијуму и pT1a хистолошком стадијуму за разлику од серумске концентрације која је управо најинтензивнија у I клиничком стадијуму и pT1a хистолошком стадијуму болести. Пацијенти са најнижом локалном експресијом сурвивина имали су значајно веће серумске концентрације у односу на пацијенте са интензивном ткивном експресијом што указује да чак и

најмање меланомске лезије без знакова локалне експресије сурвивина имају значајан капацитет за даљи раст тумора и његово ширење. Нуклеарна позитивност сурвивина је у корелацији са прогресијом болести. У метастатским меланомима је цитоплазматска експресија доминантна што указује на различиту регулацију локалне експресије сурвивина у метастазама. Интензитет експресије сурвивина је значајно већи код пацијената са већим Clark и Breslow скором. Присуство васкуларне инвазије и мешовита популација меланомских ћелија (епителоидне и вретенасте) су у позитивној корелацији са локалном експресијом сурвивина. Ткивна експресија сурвивина најинтензивнија је код пацијената код којих је дошло до лимфогене дисеминације тумора што указује да је ова група пацијената под већим ризиком за настанак удаљених метастаза. Меланоми локализовани на трupu и ногама показују највиши степен системске експресије сурвивина. Митотска активност примарног тумора снажно је повезана са интензитетом системске експресије сурвивина а присуство улцерацијеса локалном експресијом сурвивина. Степен лимфоцитне инфилтрације примарних меланома значајно је инверзно повезан са системски продуктованим сурвивином што указује на улогу специфичног анти туморског одговора у контроли раста и дисеминације меланома. DFI је значајно повезан са локалном продукцијом сурвивина у метастазама, највеће вредности су присутне код пацијената са најкраћим DFI (<6 месеци) док је присуство метастатске болести у позитивној корелацији са локалном продукцијом сурвивина. Значајно више локалне вредности сурвивина код пацијената са фокалном дистрибуцијом меланофага указују на значајну улогу локалних фактора имунског одговора. Одсуство меланофага у тумору и туморској строми доводи до повећане системске концентрације сурвивина. Значајна повезаност није утврђена између локалне и ситемске продукције сурвивина и различитих хистолошких типова меланома, присуства или одсуства регресије, прогресије болести, тока болести и између узорака примарних тумора и метастаза истих пацијената. Серумски ниво сурвивина може бити важан у иницијалном праћењу пацијената са агресивним локалним туморским растом.

4. Оцена резултата истраживања

У поглављу **дискусија** кандидат критички коментарише добијене резултате у односу на објављене резултате других студија. Овим радом су добијени нови подаци о биолошким особинама меланома везаним за ткивну и серумску експресију сурвивина и о значају овог молекула у настајању и дисеминацији меланома. За разлику од других студија заснованих само на имунохистохемијским испитивањима, резултати ове студије показују да одређен број пацијената још у најранијим фазама болести, односно у туморима мале величине показује изразито интезивну системску експресију сурвивина, која омогућује инхибицију апоптозе, стимулисану ангиогенезу, премоћ над локалним имунским одговором, и потенцијалну рану дисеминацију. Серумске концентрације сурвивина могу бити иницијални показатељи дужине DFI и пацијената код којих ће меланом имати агресивни локални раст и значајан потенцијал за даље ширење. Значајна повезаност степена инфилтрације примарних тумора лимфоцитима са серумским концентрацијама сурвивина, и присуства меланофага у тумору и туморској строми са локалном и системском продукцијом сурвивина опет указује на важну улогу локалног имунског одговора у контроли раста и дисеминације меланома. Како сурвивин као нодални молекул има улогу у инхибицији апоптозе, регулацији митозе и ангиогенезе, ћелијској покретљивости и хомеостази (канцерских) стем ћелија, он је врло интересантан као таргет за онколошке терапеутике посебно јер је утврђено да изазива хемио и радиорезистенцију у више различитих врста тумора. Више студија је показало да супресија сурвивина антисенсе олигонуклеотима, малим интерферирајућим RNK и циклин зависним киназним инхибиторима повећава ниво апоптозе туморских ћелија и редукује потенцијал туморског раста. Стога би подаци добијени овом студијом могли имати значаја у истраживањима ефикасности ових лекова.

5. Објављени радови из ове докторске тезе:

Ivan Stanojević, Milomir Gačević, **Milena Jović**, Željko Mijušković, Radoš Zečević, Lidija Zolotarevski, Ljiljana Jauković, Milica Rajović, Marjan Novaković, Karolina

Miller, Ivana Binić, Danilo Vojvodić. **Interferon alpha induced reduction in myeloid derived suppressor cell values in melanoma patients.** *Vojnosanit Pregl.* 2015;72(4):342-349.

Milena Jović, Cerović Snežana, Zolotarevska Lidija, Gačević Milomir, Stanojević Ivan, Miller Karolina, Djukić Mirjana, Saso Luciano, Jauković Ljiljana, Vojvodić Danilo. **Correlation of local and systemic expression of survivin with histopathological parameters of cutaneous melanoma.** *Vojnosanit Pregl.* 2016; November vol. 73 (No 11) OnLine-first October, 2015.

na web stranici <http://www.doiserbia.nb.rs/issue.aspx?issueid=2333>

Milomir Gačević, **Milena Jović**, Lidija Zolotarevska, Ivan Stanojević, Marijan Novaković, Karolina Miller, Vesna Šuljagić, Željko Mijusković, Danilo Vojvodić. **Association of vascular endothelial growth factor expression with patohistological parameters of cutaneous melanoma (Vojnosanit Pregl. 2016;73(5). (in press)**

6. Закључно мишљење и предлог

Докторска теза мр сц мед Милене Јовић биох. из Института за патологију и судску медицину ВМА под насловом: „**ПРОЦЕНА БИОЛОШКИХ СВОЈСТАВА ТУМОРА НА ОСНОВУ ПАТОХИСТОЛОШКОГ ТИПА, ИН СИТУ ЕКСПРЕСИЈЕ И СЕРУМСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЈА СУРВИВИНА У БОЛЕСНИКА СА МЕЛАНОМОМ**” представља оригиналан и актуелан рад.

Рад је методолошки коректно спроведен и омогућава извођење валидних закључака. Написан је јасно, концизно и систематично. Рад садржи све неопходне делове који су адекватно укомпоновани и простор који је аутор дао појединачним поглављима одговара њиховом значају.

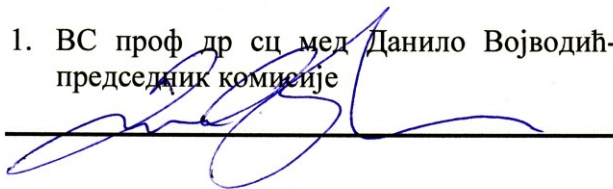
Чланови комисије сагласни су у закључку да докторска теза мр сц мед Милене Јовић биох. испуњава све предвиђене академске критеријуме и представља значајан и оригиналан допринос лечењу болесника са меланомом.

Комисија једногласно предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, обзиром да су испуњени сви законски услови за јавну одбрану докторске тезе, да извештај прихвати и одобри јавну одбрану докторске дисертације под називом: „**ПРОЦЕНА БИОЛОШКИХ СВОЈСТАВА ТУМОРА НА ОСНОВУ ПАТОХИСТОЛОШКОГ ТИПА, ИН СИТУ ЕКСПРЕСИЈЕ И СЕРУМСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЈА СУРВИВИНА У БОЛЕСНИКА СА МЕЛАНОМОМ**”.

У Београду 5.10.2015.

КОМИСИЈА

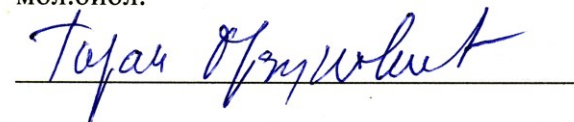
1. ВС проф др сц мед Данило Војводић-
председник комисије



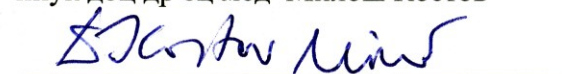
2. ВС проф др сц мед Снежана Церовић



3. ван проф др сц Горан Брајушковић
мол.биол.



4. ппук доц др сц мед Милош Костов



5. Доц др сц мед Љиљана Јауковић

