

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КРАГУЈЕВАЦ

1. Одлука Изборног већа

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-8533/3-6 од 17.11.2011. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Џенане Детанац под називом:

„ЗНАЧАЈ НЕОВАСКУЛАРИЗАЦИЈЕ И ЕКСПРЕСИЈЕ СУСЦИН-а Е ЗА ПРОЦЕНУ МАЛИГНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА УВЕАЛНОГ МЕЛАНОМА”

Чланови Комисије су:

1. **Проф. др Снежана Јанчић**, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија,
2. **Проф. др Светислав Миленковић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Офталмологија
3. **Доц. др Слободанка Митровић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка анатомија

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу следећи

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат др Џенана Детанац испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Медицинског факултета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Ценана Детанац (девојачко презиме Ђеранић) је рођена 30.09.1977. у Косовској Митровици. Основну школу и гимназију, Природно-математички смер, завршила је у Новом Пазару са одличним успехом. Медицински факултет у Београду завршила је 2005. године. По завршеном приправничком стажу положила је стручни испит за доктора медицине.

Од јануара 2006. до априла 2009. радила је у Дому здравља Здравственог центра Нови Пазар, као лекар опште праксе. У априлу 2009. уз сагласност Министарства здравља Републике Србије и Управе Здравственог центра Нови Пазар, уписала је специјалистичке студије из области Офталмологије на Медицинском факултету Универзитета у Београду.

Докторске академске студије на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Онкологија, уписала је 2008/2009. године. Усмени докторантски испит из Онкологије је положила 18.02.2011. са оценом 10 (десет).

Од октобра 2008. до фебруара 2011. радила је као сарадник у настави на Департману за биомедицинске науке, Државног универзитета у Новом Пазару. Због похађања специјалистичких студија из области Офталмологије, ангажман је привремено прекинут.

Од 2008. године је члан редакцијског Колегијума стручно-медицинског часописа "Санамед" који издаје Здравствени центар Нови Пазар.

2.2 Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „ЗНАЧАЈ НЕОВАСКУЛАРИЗАЦИЈЕ И ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN-a Е ЗА ПРОЦЕНУ МАЛИГНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА УВЕАЛНОГ МЕЛАНОМА"

Предмет: Ова ретроспективна студија ће се бавити испитивањем неоангиогенезе и експресије Cyclin-a Е у различитим клиничким стадијумима увеалног меланома, при чему ће бити утврђен ниво експресије Cyclin-a Е и густина новостворених крвних судова како у тумора који су инфилтрисали околне интраокуларне структуре, тако и тумора са екстраокуларном пропагацијом.

Хипотезе:

- Степен неоангиогенезе је у корелацији са клиничким и патолошким параметрима лоше прогнозе увеалног меланома (тј. туморски раст, предња локализација тумора, захваћеност цилијарног тела, екстраокуларно ширење тумора, митотска фаза, епителоидни ћелијски тип, старост пацијента)
- Постоји повезаност клиничких и патолошких индикатора лоше прогнозе увеалног меланома са повишеном експресијом Ендоглина у ћелијама увеалног меланома
- Постоји повезаност клиничких и патолошких индикатора лоше прогнозе увеалног меланома са повишеном експресијом Cyclin-a Е у ћелијама увеалног меланома

- Експресија Ендоглина корелира са експресијом Cyclin-a E у ћелијама увеалног меланома

2.3 Подобност кандидата

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

- **Детанац Ц** : Етиопатогенеза базоцелуларног карцинома. Медицински часопис 2010;44(4):25-29. **M53 - 16од**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Увеални меланоми су најчешће примарне интраокуларне неоплазме одраслих, али се могу јавити и у адолесцената, деце, па чак и у новорођенчади. Учесталост увеалних меланома расте са старашћу, а врх инциденце је око шездесете године и сигнификантно су чешћи у мушкараца.

У односу на анатомску локализацију увеални меланоми су најчешћи у судовњачи (око 80%), затим у цилијарном телу (око 10-15%) и око 5% ових тумора потиче из дужице. Увеални меланоми су познати као агресивни тумори који брзо дају хематогене метастазе, претежно у јетру, ређе у плућа и кости.

Још 1971. год Folkman је поставио хипотезу да је круцијални фактор за раст и метастазирање тумора ангиогенеза. Доказано је да је први регистрован процес, током ангиогенезе, активација ендотелних ћелија. Показано је да се тако активирани ендотелне ћелије умножавају двадесет и две хиљаде пута брже него у зрелом ткиву. За разлику од других, из спектра панендотелних маркера, ендоглинска (CD 105) антитета имају посебан афинитет према активираним ендотелним ћелијама које учествују у туморској ангиогенези. Minhajat и сар. (2006.) су истакли да се ендоглинска антитета везују за све новостворене ендотелне ћелије и крвне судове, а само за 20% предходно формираних (нениопластичних) крвних судова. Такође је показано да се ендоглинска антитета не везују за запаљенске и стромалне ћелије, што смањује број лажно позитивних резултата (Sead и сар, 2004; Minhajat и сар, 2006).

Последњих неколико година све више расте интересовање за разумевање механизма укључених у регулацију ћелијског циклуса и развоја рака. Уредно одвијање ћелијског циклуса зависи од фино подешене равнотеже између нивоа активираних циклина и циклин-зависних киназа (CDK) с једне стране и инхибитора циклин-зависних киназа (CDKI), као што су p16INK4, p18, p19, p21Waf/Cip1 и p27Kip1 с друге стране. Један од циљева нашег истраживања је и испитивање експресије Cyclin-a E у ћелијама увеалног меланома, чија појачана експресија би могла указати на смањену активност CDKI, што би делимично расветлило патогенезу увеалног меланома. Када концентрација циклина у ћелији расте долази до стварања комплекса са одговарајућом циклин зависном киназом и тако

започиње активација овог ензима који учествује у регулацији ћелијског циклуса. Улога дерегулације циклина, CDK и CDKI (инхибитори) у патогенези увеалног меланом је још увек у потпуности неразјашњена. Cyclin E припада групи G1/S циклина и гради Cyclin E/CDK2 комплекс са CDK2 циклин-зависном киназом што омогућује прелазак G1 и S фазу ћелијског циклуса и индукцију иницијалног процеса ДНК репликације. Mouriaux и сар. (2000.) су описали појачану експресију Cyclin-а E и смањену експресију протеина p21Waf/Cip1 и p27Kip1 у ћелијама увеалног меланом. Ови резултати указују на то да смањена активност CDKI (P21 и P27) у ћелијским линијама увеалног меланом може бити делимично одговорна за њихов малигни фенотип.

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Циљеви студије:

- Испитати улогу експресије Cyclin-а E и Ендоглина као индикативних маркера за малигни потенцијал и прогресију увеалног меланом, са истицањем њиховог прогностичког значаја.
- Хистопатолошка диференцијација увеалних меланом.
- Имунохистохемијска верификација меланоцитне хистогенезе тумора са анти НМВ-45 антителима.
- Испитати корелацију имуноензимске експресије Ендоглина (CD105) са клиничким и патолошким карактеристикама од значаја за лошу прогнозу увеалног меланом (тј. велика величина тумора, предња локализација тумора, захваћеност цилијарног тела, екстраокуларно ширење, митотска фаза, епителоидни ћелијски тип, старост пацијента).
- Испитати корелацију имуноензимске експресије Cyclin-а E са клиничким и патолошким карактеристикама од значаја за лошу прогнозу увеалног меланом (тј. велика величина тумора, предња локализација тумора, захваћеност цилијарног тела, екстраокуларно ширење, митотска фаза, епителоидни ћелијски тип, старост пацијента).
- Испитати међусобни однос имуноензимске експресије Ендоглина (CD105) и Cyclin-а E у увеалним меланомима.

Значај студије:

Након евалуације експресје Cyclin-а E, резултати ове тезе ће дати јаснији увид у разумевање механизма укључених у регулацију ћелијског циклуса и прогресију увеалног меланом. Резултати би такође требало да покажу да се Ендоглин (CD

105), за кога је доказано да је добар маркер неоангиогенезе код тумора дојке, дебелог црева и плућа, може користити као специфичан показатељ неоваскуларизације и код увеалних меланома. Добијени подаци би могли да имају не само прогностички значај, већ да укажу и на значај примене Ендоглина у процени ефикасности антиангиогене терапије.

2.6 Веза са досадашњим истраживањима

У литератури је познато да је Ендоглин важан прогностички параметар за карциноме плућа, једњака, дебелог црева, дојке, желуца, мозга, ендометријума и др., али су о значају ендоглина за прогресију увеалних меланома, подаци у литератури веома оскудни. Иако спорадичне, досадашње студије су показале предиктивну улогу ендоглина код увеалних меланома. Такође важна карактеристика увеалних меланома, поред неоваскуларизације, је и неконтролисана ћелијска пролиферација са поремећајима контроле ћелијског циклуса. Значај поремећаја ћелијског циклуса са експресијом Cyclin-a E у развоју увеалног меланома у литератури су истакли Mouriaux и сар. (2000.) и Prado са сар (2004).

Међутим компаративна анализа експресије Cyclin-a E (као регулаторног протеина ћелијског циклуса) и Ендоглина (као маркера новостворених ендотелних ћелија и крвних судова) у односу на развој и прогресију увеалног меланома, што је поље истраживања у овој дисертацији, још увек није испитивана.

2.7 Методе истраживања

2.7.1 Врста студије, студијска популација и узорковање студијске популације

Врста студије

Ради се о експерименталној студији на материјалу хуманог порекла *in vitro*.

Студијска популација

Ретроспективном студијом ће бити обухваћено 102 пацијента, 46 мушкараца и 56 жена, старости од 34 до 96 година, оболелих од примарног увеалног меланома, оперативно лечених на Клиници за очне болсети у Београду, у периоду од

04.01.2000. до 27.12.2001. године. Експериментални протокол је одобрен од стране локалног Етичког одбора.

Материјал и методе

У овом истраживању биће коришћен оперативни материјал пацијената са увеалним меланомом, калупљен у парафинске блокове и архивиран у офталмопатолошкој лабораторији Клинике за очне болести у Београду. Диференцијацијом лезија ће се направити следеће експерименталне групе: меланоми судовњаче (n=91), меланоми цилијарног тела (n=5), меланоми дужице (n=2), увеални меланоми нејасног порекла (n=4). Контролну групу ће чинити 44 невуса коњуктиве.

Након формирања контролне и експерименталних група са парафинских блокова ће се правити исечци дебљине 4-5 μ m, који ће се монтирати на високо адхерентне плочице и сушити на температури од 56 степени C у току 1 сата. После депарафинизације узорака, биће примењена рутинска HE (hematoxylin-eosin) метода за диференцијацију хистопатолошких лезија и специфична имунохистохемијска ABC метода (Хсу и сар, 1981) са анти НМВ-45, Cyclin E и CD105 - антителима.

Као позитивни контролни узорци, за тестирање наведених маркера, користиће се примарни меланоми коже, који су раније вишеструко тестирани и сигурно садрже испитиване антигене. Као негативна ткивна контрола, за имунохистохемијско бојење, користиће се узорци ткива третирано неимуном серумом уместо примарног антитела

За процену степена ангиогенезе ће се радити квантитативна анализа, мерењем густине интратуморске микроциркулације (MVD), бројањем крвних судова у зони са њиховом највећом густином ("врхове тачке"). О величини видног поља и начину бројања ћемо користити упуства Weinder-а и сар. (1992). Након добијених података о броју крвних судова, за сваког пацијента, ће се израчунати медијана у односу на коју ће бити испитаници подељени у две групе: пацијенти са ниским степеном ангиогенезе (број крвних судова у туморском ткиву мањи или једнак вредности медијане) и болесници са високим степеном ангиогенезе (број крвних судова у туморском ткиву већи од вредности медијане).

За одређивање вредности експресије регулатора ћелијског циклуса ће се користити метода "Х скор", која се изражава процентуално на најмање 100, преко микрометарске мрежице избројаних ћелија, са следећим нивоима експресије: (-; 0-5%), (+ 6-25 %), (+ +; 26-50%), (+++; 51-75%) и (++++; 75-100%).

Вредност експресије би представљао проценат имунореактивних ћелија. Затим ће бити одређена медијана и испитаници ће такође бити подељени у две групе: они са ниским степеном експресије (процент мањи или једнак вредности медијане) и они са високим степеном експресије (процент већи од вредности медијане).

Имунохистохемијски налази и степен ангиогенезе ће бити евалуирани од стране два независна експерта.

Варијабле истраживања

У студији ће се анализирати већи број варијабли које су класификоване у независне и зависне варијабле. Независне варијабле су (1) пол пацијента, (2) старост пацијента, (3) порекло тумора (судовњача, цилијарно тело, дужица, нејасног порекла), (4) димензије тумора (највећи промер и највећа проминенција изражени у милиметрима), (5) локализација тумора (ограничен на судовњачу, који укључује судовњачу и цилијарно тело, који укључује судовњачу, цилијарно тело и дужицу, ограничен на цилијарно тело, који укључује цилијарно тело и дужицу и ограничен на дужицу), (6) присуство или одсуство аблације ретине (одлубљена/није одлубљена), (7) присуство или одсуство продора у склеру, (8) екстраокуларно ширење (присуство или одсуство продора у орбиту), (9) ћелијски тип (McLean-ова модификација Callender-ове класификације). Зависне варијабле истраживања су : (1) степен експресије Cyclin-a E, (2) степен експресије Ендоглина (CD105), (3) степен ангиогенезе процењен мерењем микроваскуларне густине.

Снага студије и величина узорка.

Величина узорка процењена је на основу публикације *Ziemsse et al.* (2006.) о прогностичком значају Ендоглина (CD105) у имунохистохемијској дијагностици примарних увеалних меланома. На укупно 35 формалином фиксираних и у парафин укалупљених узорка меланома нађена је умерена до висока експресија Ендоглина (CD105) у 13 случајева (37%) и показана је значајна ($p < 0.001$) повезаност између повећане експресије Ендоглина и прогресије увеалног меланома. Употребом статистичког програма G*Power 3.0.10. за χ^2 тест, уз прихваћене вредности вероватноће грешке првог типа $\alpha=0,05$ и снаге студије од 0,95, величина узорка довољног за испитивање експресије маркера који ће се испитивати у предложеној студији процењена је на најмање 69 меланома. У нашој студији ће се испитати 102. Услед недостатка одговарајуће студије на бенигним туморима, а према претходном статистичком прорачуну, ради поређења специфичности поменутих маркера у студију ће бити укључен и узорак од 44 невуса коњуктиве.

Статистичка анализа

У статистичкој обради података, варијабле ће бити презентоване као средња вредност \pm стандардна девијација (SD). У анализи прикупљених података користиће се методе дескриптивне статистике. Сви добијени подаци ће бити табеларно и графички приказани и припремани за адекватну статистичку обраду (X^2 тест, Mann-Whitney U, Wilcoxon-Rang, Kruskal-Wallis тест и др., у зависности од потреба). При одређивању значајности разлике користиће се вероватноћа нулте хипотезе од $p = 0,05$. Сви статистички прорачуни биће урађени помоћу комерцијалног, стандардног програмског пакета SPSS (верзија 19).

2.8 Очекивани резултати докторске дисертације

Резултати ове студије би требало да покажу да појачана експресија Cyclin-a E и Ендоглина утичу на биолошко понашање увеалног меланома. Евалуација експресије испитиваних маркера у увеалним меланомима и њихова корелација са клиничко-патолошким статусом пацијента ће омогућити да се у раном стадијуму болести препознају пацијенти са високим ризиком за појаву метастаза и / или рецидива. Поред тога квантитативна анализа ангиогенезе осим дијагностичког може имати и терапијски значај због правовремене и адекватне употребе инхибитора ангиогенезе.

2.9 Оквирни садржај дисертације

Увеални меланоми су најчешће примарне интраокуларне неоплазме одраслих.. Циљ ове студије је да испита корелацију између неоваскуларизације и ћелијске пролиферације код увеалних меланома, као и да испита њихову повезаност са осталим клиничким и патолошким параметрима који су од значаја за лошу прогнозу овог тумора (тј. туморски раст, предња локализација тумора, захваћеност цилијарног тела, екстраокуларно ширење, митотска фаза, епителоидни ћелијски тип, старост пацијента).

За истраживање ће се користити биопсијски материјал (од 2000-2002. год.) офталмопатолошке лабораторије Клинике за очне болести у Београду. Нашу циљну групу ће чинити 102 случаја увеалних меланома. Диференцијацијом лезија ћемо направити следеће експерименталне групе: меланоми судовњаче (n=91), меланоми цилијарног тела (n=5), меланоми дужице (n=2), увеални меланоми нејасног порекла (n=4). Контролну групу ће чинити 44 невуса коњуктиве. На пресецима добијених са парафинских блокова ћемо применити рутинску HE методу и имунохистохемијску ABC методу са HMB-45, Cyclin E и CD105 антителима. Процену степена ангиогенезе ћемо радити мерењем густине интратуморске микроциркулације (MVD), бројањем крвних судова у зони са њиховом највећом густином. За одређивање вредности експресије Cyclina E ћемо користити методу „X skora“. Имунохистохемијски налази и степен ангиогенезе ће бити евалуирани од стране два независна експерта. Сви добијени подаци ће бити табеларно и графички приказани и адекватно статистички обрађени. За све анализе ће бити коришћен софтверски пакет SPSS верзија 19.

Очекује се да резултати студије добијени квантитативном анализом експресије испитиваних маркера у корелацији са клиничким и патолошким карактеристикама од значаја за лошу прогнозу увеалног меланома допринесу бољем разумевању понашања овог тумора, помогну у прогнози и допринесу развоју нових терапијских приступа и могућих предиктивних дијагностичких метода. Присутне разлике у експресији протеина регулатора ћелијског циклуса (Cyclin E) и Ендоглина (ЦД 105) у различитим нивоима инвазије тумора, би указале на механизме одговорне за туморску прогресију.

2.10. Предлог ментора

За ментора се предлаже **проф. др Снежана Јанчић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија .

2.11 Научна област дисертације

Медицина. Уже области онкологија, офталмологија и патологија

2.12 Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Снежана Јанчић** , председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија,
2. **Проф. др Светислав Миленковић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Офталмологија
3. **Доц. др Слободанка Митровић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу , за ужу научну област Патолошка анатомија

Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег научног рада и публикованих радова, **др Ценана Детанац** испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања и методологија су прецизно дефинисани и јасни. Предложена теза је оригинално научно дело.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза **др Ценане Детанац** бити од великог научног и практичног значаја, јер ће допринети бољем сагледавању фактора који утичу на биолошко понашање и прогнозу увеалних меланома и указати на нове терапијске модалитете и примену Ендоглина у процени ефикасности антиангиогене терапије.
4. Комисија сматра да је за наведено истраживање прикладнији назив „Значај неоваскуларизације и експресије Суclin-а Е за прогресију увеалног меланома“, будући да одражава значај наведених маркера не само за процену малигног потенцијала већ и њихове нивое експресије кроз читаву фазу карциногенезе (фаза прогресије) увеалног меланома, што је и предмет овог истраживања, тј испитивање експресије наведених маркера када је тумор практично у фази прогресије.

5. Комисија предлаже Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **др Џенане Детанац** под називом „**Значај неоваскуларизације и експресије Cyclin-a E за прогресију увеалног меланома**” и одобри њену изравду.

Проф. др Снежана Јанчић , председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија

Проф. др Светислав Миленковић, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Офталмологија

Доц. др Слободанка Митровић, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Патолошка анатомија

(У Крагујевцу, 10.01.2012.)