

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМЉЕНО:		11.05.17	
Орг.јед.	Број	Прегле:	Вредност
05	5964/5-5		

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО- НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-260/31, од 08.03.2017. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Јелене Пантић Бишевац, под називом:

**„Серумски редокс и интерлеукин 27 статус
код пацијената са примарним меланомом коже“**

Чланови комисије су:

1. **проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник
2. **проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. **проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Кандидат Јелена Пантић Бишевац рођена је 23.10.1984. године у Крагујевцу, где је завршила основну школу и Прву крагујевачку гимназију. Фармацеутски факултет у Београду, смер медицинска биохемија, уписала је школске 2003/2004. године, а завршила 19.03.2009. године, са просечном оценом 9,28 (девет и 28/100), чиме је стекла стручно звање магистар фармације.

Докторске академске студије уписала је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Молекулска медицина.

Од 2012. године запослена је у служби за лабораторијску дијагностику Института за медицинску биохемију ВМА. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Серумски редокс и интерлеукин 27 статус код пацијената са примарним меланомом коже“

Предмет: Анализа серумских вредности интерлеукина 27 и параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом и здраве контроле и корелација са клиничко-патолошким карактеристикама тумора.

Хипотеза: Серумска концентрација интерлеукина 27 је смањена а вредности параметара оксидативног стреса повећане код пацијената са меланомом, у поређењу са здравом контролом.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини у часопису категорије M23 који излази на једном од водећих светских језика у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Pantic Bisevac J, Stanojevic I, Mijuskovic Z, Banovic T, Djukic M, Vojvodic D. High interleukin 27 production is associated with early clinical stage and localized disease in patients with melanoma. Journal of Medical Biochemistry DOI: 10.1515/jmb-2016-0018
M23

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Меланом је малигни тумор меланоцита, који се доминантно јавља у кожи, али се може развити и у слузници, оку и у било којем ткиву које садржи меланоците. Меланом је најређи облик кожног малигнитета, али и најагресивнији јер је одговоран за 60% смртних исхода повезаних са малигним туморима коже.

Оксидативни стрес настаје када се услед прекомерног стварања и/или неадекватног уклањања слободних радикала наруши редокс хомеостаза организма. Оксидативно/нитрозативно оштећене биомолекуле, укључујући ћелијску и митохондријалну дезоксирибонуклеинску киселину, ремете сигнализацију и физиолошку функцију ћелије, празне се ћелијски депои донора редукционих еквивалената и ћелија се енергетски исцрпљује. Свеукупно, ове промене могу индуковати апоптозу. Антиоксидативни систем (обухвата ензиме антиоксидативне одбране и неензимске антиоксидансе), задужен за уклањање/неутрализацију слободних радикала, такође је одговоран за репарацију оксидативно/нитрозативно оштећених биомолекула.

Од реактивних кисеоничних врста, један од подтипова- хидроксил радикал (HO^\bullet), спада у најагресивније и настаје хомолитичком разградњом водоник пероксида (H_2O_2) или Фентоновом реакцијом, у којој су полазни реактанти редукована форма метала са

прелазном валенцом и H_2O_2 . За разлику од супероксидног анјона ($\text{O}_2^{\bullet-}$), његова протонowana форма (HO_2^{\bullet}), као и HO^{\bullet} могу иницирати липидну пероксидацију (оксидација незасићених масних киселина фосфолипидних молекула ћелијских мембрана). Најчешће коришћен биохемијски маркер оксидативног оштећења ћелијских мембрана је малондиалдехид (MDA), деградациони производ интрамолекуларно циклизованих липидних хидропероксида (ROOH). Од ензима антиоксидативне заштите испитиваће се супероксид димутаза (SOD) која је задужена за аутооксидацију (димутацију) $\text{O}_2^{\bullet-}$ у H_2O_2 и молекуларни кисеоник (O_2) и каталаза (CAT), која катализује редукцију H_2O_2 до воде (H_2O).

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Значај студије се огледа у томе што би резултати овог истраживања указали на корелацију серумске вредности IL-27 и вредности параметара оксидативног стреса са клиничко-патолошким карактеристикама меланома.

Циљ студије

1. Одредити вредности IL-27 и параметара оксидативног стреса (активност ензима супероксид димутазе, укупне- tSOD и MnSOD, активност CAT, концентрације $\text{O}_2^{\bullet-}$ и MDA) у узорцима серума оболелих од меланома и здравих контролних особа.
2. Испитати да ли вредности мерених параметара корелирају са клиничким стадијумом болести, степеном лимфоваскуларне инвазије, присуством микросателитоза, хистолошким типом меланома (класификација по Clark-у и Breslow-у), патохистолошким T стадијуму, присуством улцерација, степеном перинеуралне инвазије, присуством митоза, као и обликом ћелија тумора.
3. Испитати међусобну повезаност концентрација IL-27 и вредности параметара оксидативног стреса (tSOD, MnSOD, CAT, MDA и $\text{O}_2^{\bullet-}$) у узорцима серума оболелих од меланома

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Канцерогенеза је вишефазни процес који обухвата: иницијацију, промоцију и прогресију болести. Последица прекомерне продукције слободних радикала је оштећење ћелијске и митохондриске ДНК. Измењена ДНК и поремећај ензимских репарационих механизма за поправку измењене ДНК узрокују промене на нивоу хромозома, када се мења експресија гена и иницира фаза прогресије канцерогенезе. Gadjeva и сар. су показали статистички значајно повећану продукцију MDA и реактивних кисеоничних врста код пацијената оболелих од меланома, повећану активност CAT и смањену активност SOD.

Комплексна интеракција ћелија имунског система и ћелија тумора је регулисана бројним молекулама. Један од њих је IL-27, хетеродимерни цитокин који припада фамилији IL6/IL12 цитокина. IL27 игра битну улогу у одбрани организма од тумора. IL27 појачава цитотоксичку активност NK ћелија, као и стварање CTL лимфоцита. IL27 стимулише клонску експанзију наивних CD4⁺T лимфоцита и заједно са IL-12 стимулише CD4⁺T лимфоците и NK ћелије да продукују IFN- γ . Shimizu и сар. су показали способност IL27 да инхибира раст и метастазе у моделу мишјег меланома, као и његову способност да индукује антиангиогене хемокине. Друга студија је показала да су пацијенти са карциномом простате имали статистички значајно мање вредности IL-27 у односу на контролну групу, али нису нашли статистички значајну разлику између пацијената који су били у почетној и узнапредовалој фази болести. Са друге стране показано је да експресија IL-27 код меланома није повезана са регресијом тумора већ са напредовањем болести. IL-27 поред антитуморских ефеката индукује продукцију регулаторних лимфоцита (Treg1) који продукују инхибиторни цитокин IL10. Антиангиогени и антипролиферативни ефекат IL-27 указују на могућност употребе овог цитокина у терапији тумора, стога остаје неразјашњено како усмерити ефекте овог цитокина ка елиминацији тумора и поред тога што може имати ефекте који стимулишу настанак тумора.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Студија пресека (клиничка студија).

Популација која се истражује

У студију ће бити укључено 80 испитаника са дијагнозом меланома, просечне старости око 50 година и 30 здравих испитаника. Студија ће бити спроведена на Клиници за кожне и полне болести, Клиници за пластичну хирургију, Институту за патологију и судску медицину и Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије.

Узорковање

Критеријум за укључење у студијум биће болесници са дијагнозом меланома. Болесници ће бити класификовани на основу: стадијума болести дефинисаног према седмом издању AJCC (American Joint Committee on Cancer), хистолошког типа меланома, класификације по Clark-у и Breslow-у, облика ћелија, патохистолошког Т стадијума, присуства: лимфоваскуларне инвазије, микросателитоза, улцерације, перинеуралне инвазије и митоза. Критеријум за искључивање из студије биће: меланом ока и слузокоже, аутоимуне болести, друге малигне болести, симптоми и знаци акутне инфекције, узимање имunosупресивне терапије. Контролну групу ће представљати здрави испитаници. Сви испитаници укључени у студију потписаће Образац информативног пристанка који је одобрио Етички комитет Војномедицинске академије.

Варијабиле које се мере у студији

Независне варијабле: дијагноза меланома, стадијум болести

Зависне варијабле: концентрација IL-27, вредности параметара оксидативног стреса: SOD (tSOD и MnSOD), супероксидни ањон, MDA и CAT.

Збуњујуће варијабле: старост, друге болести које могу да утичу на мерене параметре.

Узимање узорка крви

Испитаницима ће бити узет узорак периферне венске крви из вене надлактичне јаме. Један сат од узимања узорка, крв ће бити центрифугирана у циљу добијања серума који ће бити одвојен и замрзнут на -80°C , до завршетка прикупљања свих узорака.

Методологија мерења испитиваних параметара

Концентрација IL27 ће бити одређивана методом сендвич теста ELISA, коришћењем комерцијалног кита. Вредности параметара оксидативног стреса биће одређиване методама спектрофотометрије. MDA ће се одређивати применом теста тиобарбитурна киселина реагујуће супстанце (TBARS) (Girotti, 1991), $\text{O}_2^{\bullet-}$ применом нитроблу тетразолијум (NBT) теста (Auclair, 1985), tSOD и MnSOD методом заснованој на способности овог ензима да блокира аутооксидацију адреналина у базној средини (Sun i Zigman, 1978) и CAT ће се одређивати реакцијом са амонијум молибдатом (Góth, 1991).

Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната узимајући алфа као 0,05 и снагу студије од 0,8 за Student's t тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3.1. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролних група, утврђен је минимални број од 20 болесника по групи. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student's t тест за два независна узорка или Mann-Whitney тестом) између две групе, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS верзија 20.

Статистичка обрада података

Поређења међу различитим групама обавиће се применом непараметријског теста ANOVA-Kruskal Wallis или применом параметријског ANOVA теста уколико је расподела података нормална. Неспарена поређења између група анализираће се применом непараметријског теста Mann-Whitney или параметријског теста (Student t тест). За процену статистичке повезаности међу различитим параметрима користиће се Pearson-ов (параметријска корелација) и Spearman-ов тест корелације (непараметријска корелација). Разлике ће бити сматране статистички значајним уколико је $p \leq 0.05$. Резултати ће бити

представљени као средња вредност \pm стандардна грешка ($X \pm SEM$). Сви статистички прорачуни биће урађени коришћењем GraphPad Prism 5 version 5.01 софтвера.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Ово истраживање нам може дати нове податке о односу серумског IL-27 и параметара оксидативног стреса са клиничко-патолошким карактеристикама тумора. Очекује се да вредности IL-27 буду смањене код пацијената оболелих од меланома у односу на контролну групу и да се смањују са прогресијом болести. Супротно овоме, очекује се да ће вредности параметара оксидативног стреса бити повећане код пацијената оболелих од меланома у односу на контролну групу (здраве испитанике) и да ће расти са прогресијом болести.

2.9. Оквирни садржај дисертације

У овој докторској дисертацији биће анализирани серумске вредности IL-27 и параметара оксидативног стреса код пацијената са малигним меланомом и здраве контроле. У студију ће бити укључени оболели од меланома, као и група здравих испитаника. Концентрација IL-27 у серуму биће измерена методом сендвич ELISA теста, док ће параметри за процену оксидативног стреса у серуму (супероксидни анјон, укупна и Mn супероксид димутаза, малондиалдеhid и каталаза) бити мерени спектрофотометријски. Може се очекивати да концентрација IL-27 буде смањена у серуму болесника са меланомом у односу на здраве испитанике и да опада са напредовањем болести. Очекује се да ће вредности параметара оксидативног стреса бити повећане код болесника са меланомом у односу на контролну групу (здраве испитанике) и да ће бити у корелацији са прогресијом болести.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Проф. др Мирјана Ђукић**, редовни професор Фармацеутског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Токсикологија. 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

Радови у вези са темом докторске дисертације:

1. Djuric, A. Begic, B. Gobeljic, M. Ninkovic, I. Stanojevic, D. Vojvodic, A. Pantelic, G. Zebic, V. Prokic, B. Dejanovic, I. Stojanovic, M. Pavlica, D. Djukic, L. Saso, D. Djurdjevic, M. Pavlovic, A. Topic, D. Vujanovic, I. Stevnovic, **M. Djukic**. Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium, *Food and Chemical Toxicology*, 2015; 86: 25-33.
2. Stanojevic, K. Miller, L. Kandolf-Sekulovic, Z. Mijuskovic, L. Zolotarevski, M. Jovic, M. Gacevic, **M. Djukic**, N. Arsenijevic, D. Vojvodic A subpopulation that may correspond to granulocytic myeloid-derived suppressor cells reflects the clinical stage and progression of cutaneous melanoma. *Int.Immunol.* (2015) doi: 10.1093/intimm/dxv053.
3. Milena Jović, Snežana Cerović, Lidija Zolotarevska, Milomir Gačević, Ivan Stanojević, Karolina Miller, **Mirjana Djukić**, Luciano Saso, Ljiljana Jauković, Danilo Vojvodić. Correlation of local and systemic expression of survivin with histopathological parameters of cutaneous melanoma. (2015 DOI: 10.2298/VSP150519119J.
4. Naveena Yanamala, Alexander A. Kapralov, **Mirjana Djukic**, Jim Peterson, Gaowei Mao, Judith Klein-Seetharaman, Detcho A. Stoyanovsky, Jan Stursa, Jiri Neuzil and Valerian E. Kagan. Structural re-arrangement and peroxidase activation of cytochrome c by anionic analogues of vitamin tocopherol-succinate and tocopherol-phosphate. *J. Biol. Chem.* 2014;289(47):32488-98
5. **Djukic M**, Jovanovic M, Ninkovic M, Stevanovic I, Djurdjevic D, Vasic U. Influence of glutathione reductase on diquat neurotoxicity assessed by oxidative/nitrosative stress in the cortex of intrastrially treated rats. *Acta Vet* 2012; 62 (5-6): 553-568.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Молекулска медицина: Клиничка и експериментална фармакологија.

5. Научна област чланова комисије

1. **проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник
2. **проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. **проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан

Закључак и предлог комисије

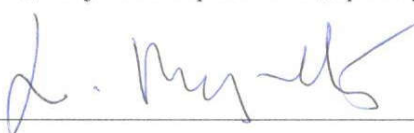
1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове *mg ph* Јелене Пантић Бишевац, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита серумске концентрације IL-27 и параметара оксидативног стреса код пацијената са меланомом и здравих контрола и да их упореди са клиничко-патолошким карактеристикама тумора.
3. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата *mg ph* Јелене Пантић Бишевац са измењеним називом „**Серумске вредности интерлеукина 27 и параметара оксидативног стреса код пацијената са примарним меланомом коже**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

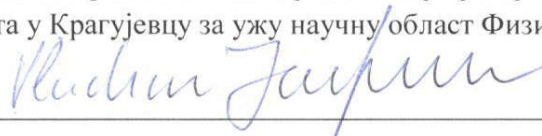
1. **проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник



2. **проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан



3. **проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан



У Крагујевцу, 21.04.2017.