

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-03-1044/45, од 02.11.2016. године,, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Младена Павловића, под називом:

### „УТИЦАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ IL-32 НА СТВАРАЊЕ КРВНИХ СУДОВА У КАРЦИНОМУ ЖЕЛУЦА”

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Драган Чановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник
2. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
3. **Проф. др Жељко Лаушевић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хирургија, члан
4. **Доц. др Драгче Радовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
5. **Доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

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

## **2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације**

### **2.1. Кратка биографија кандидата**

#### **Лични подаци**

Младен (Драгомир) Павловић је рођен 19.05.1977. у Крагујевцу. Медицински факултет у Крагујевцу је завршио 2003. године чиме је стекао звање доктора медицине. У току школовања у више наврата је награђиван као најефикаснији студент и за постигнуте успехе. У току школовања је активно учествовао у раду Катедре за Хистологију и ембриологију, где је био ангажован у својству демонстратора. Од четврте године студија био је стипендиста Републичке фондације за развој научног и уметничког подмлатка, а по завршетку студија након уписа магистарских студија стипендиста је Министарства науке и заштите животне средине, и активни учесник на пројекту Министарства из области основних истраживања бр. ОИ 1327. Академске докторске студије је уписао школске 2005/2006 године, а усмени докторски испит положио у септембру 2012. године.

Од 2006. је стално запослен у Клиничком центру Крагујевац на Клиници за општу и грудну хирургију, у својству клиничког лекара. Од 2008. године уписао је специјалистичке студије Опште хирургије на Медицинском факултету у Београду. Након тога је у својству лекара на специјализацији из опште хирургије, уз одобрење Шефа катедре, а на основу потреба катедре, ангажован у извођењу практичне наставе на предмету Хирургија у својству сарадника - волонтера, као и у организацији рада хируршке катедре. У два наврата је одлуком декана Факултета медицинских наука биран у звање сарадника у настави за ужу научну област Хирургија. Специјалистички испит је положио 27.01.2014. године и тиме стекао звање специјалисте опште хирургије. Одлуком декана од 28.05.2014. Факултета медицинских наука изабран је у звање сарадника у звању асистента за ужу научну област Хирургија. Говори енглески и руски језик, добро познаје рад на рачунару.

### **2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе**

**Наслов:** „Утицај експресије IL-32 на стварање крвних судова у карциному желуца”

**Предмет:** Испитивање улоге интерлеукина-32 у процесу стварања крвних судова код пацијената са карциномом желуца. Ово истраживање би требало да по први пут испита утицај интерлеукина-32 на процес ангиогенезе у туморском и перитуморском ткиву карцинома желуца, као и међусобни утицај и повезаност интерлеукина-32 са проинфламацијским и проангиогеним цитокинима IL-8 и IL-17.

**Хипотезе:** Експресија IL-32, VEGF, IL-8 и IL-17 значајно је већа у туморском у односу на перитуморско ткиво и ткиво здраве желудачне слузнице; IL-32 је у корелацији са повишеним маркерима ангиогенезе у ткиву карцинома желуца; експресија IL-32 је позитивној корелацији са другим проангиогеним цитокинима (IL-17 и IL-8).

### 2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини у часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

**Pavlovic M, Milosevic B, Radovanovic D, Cvetkovic A, Trifunovic B, Canovic D, Mitrovic S, Jovanovic M, Spasic M, Vulovic M, Stojanovic B, Jeremic D and Jevdjic J. Malignant fibrous histiocytoma of the right upper leg – a case report. Vojnosanitetski pregled DOI:10.2298/VSP160512237P M23**

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Карцином желуца представља један од најагресивнијих тумора и трећи је узрок смртности међу малигним болестима у свету. У новије време утврђено је да поједини биолошки маркери, између којих и проинфламаторни цитокини IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-17 могу утицати на исход карцинома желуца. Ћелије имунског система које инфилтришу туморско ткиво започињу инфламаторну реакцију, чији исход није увек елиминација тумора који се развија, већ је често туморска прогресија.

Добро је позната чињеница да је ангиогенеза неопходна за раст солидног тумора. Ангиогенеза представља процес формирања нових из већ постојећих крвних судова, а дешава се у разним фазама прогресије тумора и представља кључни корак за инвазију и метастазирање тумора. Ангиогенеза је строго регулисан процес балансом између проангиогених и антиангиогених фактора у туморској микросредини. Истраживања су потврдила да је туморска ангиогенеза директно повезана са хематогеним метастазирањем карцинома желуца.

Интерлеукин-32 је плурипотентни проинфламаторни цитокин, са још увек недовољно испитаним функцијама. Излучују га NK (енгл. natural killer) ћелије, дендритске ћелије, Т-лимфоцити, епителне и ендотелне ћелије, фибробласти, кератиноцити. Досадашњим истраживањима утврђено је да је IL-32 важан модулатор урођене и стечене имуности. Овај протеин индукује ослобађање више проинфламацијских цитокина, као што су: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17. Утврђена је његова улога у многим аутоимунским обољењима: реуматоидном артритису, анкилозирајућем спондилитису, псоријази, улцерозном колитису и Кроновој болести, као и у хроничној опструктивној болести плућа, астми и атопијском дерматитису. Повишене вредности у серуму су нађене код вирусних инфекција Influenza, HIV-1, хепатитис- В и -С. Детектоване су повишене серумске вредности и/или ткивна експресија овог цитокина код многих малигних обољења: карцинома плућа, дојке, колоне, бубрега, једњака, јетре, панкреаса, штитасте жлезде, желуца и леукемије. Показано је и да различите изоформе имају различита дејства у одређеној микросредини и врсти ћелије. Утврђена је и значајна улога IL-32 у ћелијској апоптози, миграцији и пролиферацији. Улога IL-32 у ангиогенези није јасно дефинисана. Фактор раста васкуларног ендотела-А (енгл. Vascular endothelial growth factor A- VEGF-A) је кључни медијатор раста крвних судова. Интерлеукин-8 је проинфламаторни хемокин који има значајну улогу у туморској микросредини. Доказано је његово директно проангиогено дејство, а примећено је и да је IL-8 удружен са растом и метастазирањем карцинома желуца; важан је за лимфну и венску инвазију и може бити прогностички фактор. Потврђено је да је IL-32 један од моћних стимулатора секреције IL-8.

Ранијим студијама је утврђено да постоји повезаност IL-32 и IL-17. Наиме, показано је да IL-32 активно учествује у урођеној и стеченој имуности, између осталог и стимулацијом продукције тип 17 цитокина. Интерлеукин-17 је проинфламаторни цитокин, са повећаном експресијом у карциному јајника, колона и желуца. Утврђено је да има про-ангиогено дејство, и укључен је у многим алергијским, аутоимуним и инфламацијским обољењима. Улога IL-32 у ангиогенези карцинома желуца још увек није утврђена, као ни јасна повезаност експресије овог проинфламаторног цитокина са растом и прогресијом тумора.

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

### *Значај студије*

Значај студије се огледа у томе што би резултати овог истраживања могли да омогуће боље разумевање биологије тумора, да разјасне улогу и повезаност испитиваних маркера у процесу ангиогенезе карцинома желуца што би могло да укаже на потенцијални терапијски приступ у лечењу карцинома желуца.

### **Главни циљ**

Основни циљ планираног истраживања је да се испита улога интерлеукина-32 у процесу ангиогенезе карцинома желуца.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. анализа експресије IL-32, VEGF, IL-8, IL-17 и одређивање микроваскуларне густине (енгл. MicroVascular density- MVD) у туморском, перитуморском и ткиву здраве слезнице желуца;
2. Испитивање повезаности експресије IL-32 са експресијом VEGF и са MVD у туморском, перитуморском и ткиву здраве слезнице желуца;
3. Испитивање повезаност експресије IL-32, VEGF и MVD са експресијом IL-8 и IL-17 у ткиву ;
4. Испитивање повезаност експресије IL-32, VEGF, MVD, IL-8 и IL-17 са клиничким и патолошким параметрима карцинома желуца.

## **2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима**

Досадашње студије су показале да повишена експресија IL-32 корелира са лошијим стадијумом карцинома желуца (према ТМН класификацији) и са израженијом лимфоваскуларном инвазијом. Студија из 2014. године (Nold-Petry SA и сар.) показала је да овај цитокин промовише ангиогенезу *in vitro* и *in vivo*, једним делом преко интегрина  $\alpha V\beta 3$  и  $\alpha V\beta 6$  и сигналног пута који укључује фокалну адхезивну киназу и паксиллин, независно од VEGF. Друге студије указују на то да код хроничне опструктивне болести плућа овај цитокин доприноси инхибицији ангиогенезе путем супресије VEGF. Ранија

истраживања су показала повезаност интерлеукина-32 са многим проинфламаторним и проангиогеним цитокинима, између осталих и интерлеукинима 8 и 17, чију продукцију стимулише. У досадашњој литератури нема података о улози IL-32 у процесу ангиогенезе код карцинома желуца.

## **2.7. Методе истраживања**

### **2.7.1. Врста студије**

Студија је дизајнирана као ретроспективно-проспективна. Испитиваће се патогенетски механизми болести коришћењем патохистолошког материјала узетом од пацијената, из постојеће архиве.

### **2.7.2. Популација која се истражује**

У студији ће се користити ткивни узорци пацијената код којих је ендоскопским прегледом, биопсијом и патохистолошки потврђена дијагноза карцинома желуца. Такође, оперативно је утврђено да је тумор ресектабилан, и спроведена је одговарајућа процедура-ресекција желуца одређеног обима или тотална гастректомија. Анализираће се туморско ткиво, перитуморско ткиво и здрава слузница (без елемената тумора) као контролна група. Туморско и перитуморско ткиво анализираће се на истом ткивном исечку, а дефинисати на препарату обојеном стандардним хематоксилин-еозин бојењем. Перитуморско ткиво се пружа у појасу од око 2 cm око тумора.

### **Патохистолошко испитивање**

У студију ће бити укључени пацијенти са карциномом желуца који су оперативно лечени (гастректомија/ресекција желуца) на Клиници за општу и грудну хирургију Клиничког центра Крагујевац, а којима је патохистолошким анализом верификован карцином у Центру за патоанатомску дијагностику Клиничког центра Крагујевац, почев од 2009. године до краја 2016. године. Патохистолошка дијагноза и стандардни параметри (величина тумора, нодални статус, хистолошки тип, хистолошки градус, инвазија лимфних и крвних судова, митотски индекс, моноклеарна стромална реакција) биће утврђени на Н&Е препаратима. Класификација тумора ће бити учињена према UICC-TNM критеријумима, а градираће према класификацији светске здравствене организације (енгл. WHO).

### **Имунохистохемијско испитивање**

За имунохистохемијско одређивање нивоа експресије маркера (IL-32, VEGF, CD34, CD105, IL-17, IL-8) у ткивном материјалу користићемо фиксиране узорке ткива укалупљене у парафин. За имунохистохемијску анализу парафински узорци ткива ће бити сечени на 4-5 микрона, а затим ће се урадити депарафинизација, тј. ткивне исечке ћемо потапати у ксилол и у опадајућим концентрацијама алкохола (100%, 96%, 70% и 50%). У циљу демаскирања антигена исечке ћемо третирати у цитратном пуферу (pH 6.0) у микроталасној пећници. Када се препарати охладе и исперу у раствору PBS-а, инкубираће се са примарним антителима 1 сат на собној температури у влажној комори. Користићемо

одговарајућа моноклонска антитела (антихумана IL-32, VEGF, CD34, CD105, IL-17 и IL-8-антитела). Затим ће се за њихову детекцију користити ABC систем. Ткивни пресеци ће се анализирати под светлосним микроскопом. Експресија ће се дефинисати као позитивна ако је обојено више од 10% туморских ћелија и негативна ако је обојено мање од 10% туморских ћелија. Сва имунохистохемијска бојења биће изведена уз контролу квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контрола према пропозицијама UK NEQAS (UK National Ext Quality Assesment for Immunocytochemistry).

### **Одређивање микроваскуларне густине – MVD**

Микроваскуларну густину (енгл. *microvascular density* - MVD) процењиваћемо имунохистохемијском методом, применом анти-CD34 и анти-CD105 антитела. Користићемо *Carl Zeiss Axioskop 40* светлосни микроскоп. Појединачне ендотелне ћелије или кластере позитивне на CD34 и CD105 детектоваћемо као крвне судове. Присуство крвних ћелија или фибрина без детектованих ендотелних ћелија нећемо анализирати као микроваскуларне елементе. Крвни судови са мишићним зидом неће бити бројани. Све плочице ћемо првобитно анализирати на микроскопским увећањима 40x и 100x. На овај начин ћемо одредити три „жаришта“ (eng. „hot spots“) тј. поља са највећом микроваскуларном густином, а затим ћемо ова поља фотографисати на 200x и/или 400x увећању применом *Carl Zeiss AxioCam ICc1* дигиталне камере. Независно, два патолога ће применом *Carl Zeiss AxioVision v.4.x* софтвера спровести анализу генерисаних фотографија и утврдити број микроваскуларних структура у претходно одабрана три „жаришта“. MVD (микроваскуларне структуре/HPF) ћемо израчунати према критеријумима које су поставили Weidner и сарадници, тј. као средња вредност појединачних MVD у три одабрана микроскопска фокуса.

### **2.7.3. Узорковање**

Искључујући критеријуми за одабир пацијената ће бити: преоперативно спроведена неoadјувантна хемио и/или радиотерапија; као и немогућност извођења ресекционе процедуре.

### **2.7.4. Варијабле које се мере у студији**

**Независне варијабле:** карцином желуца.

**Зависне варијабле:** имунохистохемијска експресија IL-32, VEGF, CD34, CD105, IL-17 и IL-8 у туморском и перитуморском ткиву карцинома желуца, прогностички индекси.

**Збуњујуће варијабле:** старост болесника; хистоморфолошке карактеристике ткивних узорака и клиничке карактеристике болесника са карциномом желуца.

### **2.7.5. Снага студије и величина узорка**

Величина узорка је израчуната на основу података о експресији IL-32 у карциному желуца и у здравој слузници, а ови подаци су добијени из студије Seo ЕН и сарадника. Према подацима из литературе IL-32 је детектован код 29% пацијената са карциномом желуца, док у здравој слузници није детектована експресија овог цитокина. Студијски узорак је израчунат узимајући да је  $\alpha=0.05$ , а снага студије  $1-\beta= 0,95$  (95%) за  $\chi^2$  тест, поредећи групе међу собом. Применом комерцијалног програма G Power v.3.0.10 утврдили смо да је за дате критеријуме неопходан узорак од најмање 48 пацијената.

### **2.7.6. Статистичка обрада података**

За статистичку обраду података добијених резултата биће употребљен комерцијални програмски пакет SPSS (верзија 22.0, SRSS Inc., Chicago, IL). У анализи добијених резултата користимо: методе дескриптивне статистике, Studentov T test и/или Man-Whitney-јев тест, ANOVA-у и/или Kruskal-Wallis-ов тест,  $\chi^2$  тест, Pирson-ов или Spearman-ов коефицијент корелације, мултиваријантну бинарну логистичку регресију, ROC криву (уз одређивање „cut off“ вредности, сензитивности и специфичности). Одређивањем сензитивности и специфичности теста биће детерминисан ниво практичне поузданости статистичке анализе. Дефинитивни избор статистичких метода зависиће од природе добијених резултата. Праг значајности ( $\alpha$ ) за сва статистичка израчунавања биће 0,05.

## **2.8. Очекивани резултати докторске дисертације**

На основу података из досадашње литературе очекује се да је експресија IL-32, VEGF, IL-8 и IL-17 значајно је већа у туморском у односу на перитуморско ткиво и ткиво здраве желудачне слузнице. Очекује се да је IL-32 у корелацији са повишеним маркерима ангиогенезе у ткиву карцинома желуца, и стимулише процес ангиогенезе код овог малигнома. Такође, очекује се позитивна корелација IL-32 са другим проангиогеним цитокинима (IL-17 и IL-8).

## **2.9. Оквирни садржај докторске дисертације**

Анализом ткивне експресије код пацијената са карциномом желуца испитаће се природа везе интерлеукина-32 и процеса ангиогенезе у туморском и перитуморском ткиву карцинома желуца. Ово истраживање ће нам открити и међусобни утицај и повезаност интерлеукина-32 са проинфламацијским и проангиогеним цитокинима IL-8 и IL-17. Резултати истраживања могу да омогуће боље разумевање биологије тумора и да разјасне улогу и повезаност испитиваних маркера у процесу ангиогенезе карцинома желуца.

### 3. Предлог ментора

За ментора се предлаже доц. др **Иван Јовановић**, доцент Факултета Медицинских наука у Крагујевцу, за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

Радови у вези са темом докторске дисертације:

1. **Jovanovic I**, Radosavljevic G, Mitrovic M, Lisnic Juranic V, McKenzie ANJ, Arsenijevic N, Jonjic S. and Lukic ML. ST2 Deletion Enhances Innate and Acquired Immunity to Murine Mammary Carcinoma. Eur J Immunol 2011; 41(7):1902-1912.
2. **Jovanovic I**, Pejnovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Milovanovic M, Arsenijevic N, Lukic M. Interleukin-33/ST2 Axis Promotes Breast Cancer Growth and Metastases by Facilitating Intratumoural Accumulation of Immunosuppressive and Innate Lymphoid Cells, Int J Cancer (2014), 134(7):1669-16682.
3. **Jovanovic I**, Pejnovic N, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML. IL-33/ST2 Axis in Innate and Acquired Immunity to Tumors. OncoImmunology 2012; 1(2):229-231
4. Milosavljevic MZ, **Jovanovic IP**, Pejnovic NN, Mitrovic SL, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ, Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. Oncotarget 2016; 7(14): 18106–18115.
5. N.D. Zdravkovic, **I.P. Jovanovic**, G.D. Radosavljevic, A.N. Arsenijevic, N.D. Zdravkovic, S.Lj. Mitrovic, N.N. Arsenijevic. Potential Dual Immunomodulatory Role of VEGF in Ulcerative Colitis and Colorectal Carcinoma. Int J Med Sci 2014; 11(9): 936-947.

### 4. Научна област дисертације

Медицина.



## 5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Драган Чановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник
2. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
3. **Проф. др Жељко Лаушевић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хирургија, члан
4. **Доц. др Драгче Радовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
5. **Доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

## Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Младена Павловића, комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је оригинална и научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Резултати ове студије могли би да открију природу везе IL-32 са процесом ангиогенезе код пацијената оболелих од карцинома желуца и бити од користи у прецизнијем стадирању болести и адекватном лечењу оболелих од карцинома желуца, што би омогућило бољу прогнозу и дуже преживљавање оболелих.
3. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу, да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Младена Павловића под називом: „Утицај експресије IL-32 на стварање крвних судова у карциному желуца“ и одобри њену израду.

## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **Проф. др Драган Чановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник
- 

2. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
- 

3. **Проф. др Жељко Лаушевић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хирургија, члан
- 

4. **Доц. др Драгче Радовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
- 

5. **Доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
- 

У Крагујевцу, 21.11.2016.