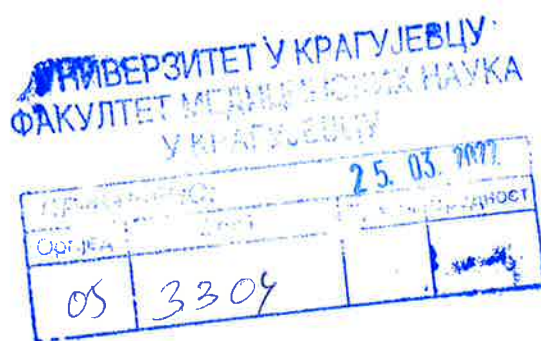


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



**ОДЛУКА ВЕЋА ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ  
О ФОРМИРАЊУ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ ЗАВРШЕНЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној дана 19.01.2022., одлуком бр. IV-03-6/21 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „**Компаративна анализа имунохистохемијске експресије Stathmina 1, E-cadherina, Ki-67, p53 и bcl2 у интестиналном и дифузном карциному желуца**“ кандидата Миљана Зиндовића, у следећем саставу:

1. **Проф. др Драгче Радовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник;
2. **Проф. др Филип Вукмировић**, ванредни професор Медицинског факултета у Подгорици Универзитета Црна Гора за ужу научну област Патологија, члан;
3. **Проф. др Наташа Здравковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Интерна медицина, члан;

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију кандидата Миљана Зиндовића и подноси Наставно-научном већу следећи

## ИЗВЕШТАЈ

### 2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Четврти по учесталости малигни тумор, а други, одмах иза карцинома плућа, узрок смрти од карцинома, са стопом петогодишњег преживљавања мањом од 30%, карцином желуца је значајан здравствени проблем широм света. Често клинички прикривен, инфилтрише зид желуца, перитонеум и даје лимфогене и хематогене метастазе које су некада његова прва клиничка манифестација. Ако се додају некомплетна сазнања о преканцерозним лезијама и наслеђу, непотпуно дефинисана патогенеза, и неусклађене класификације, разумљиво је непрестано интересовање истраживача за ову болест.

У патогенези желудачних карцинома опште је прихваћен модел вишестепне карциногенезе, од *H.pylori* индукованог хроничног гастритиса преко мултифокалне атрофије, интестиналне метаплазије и дисплазије до карцинома, назване “*Correa* секвенца“, али између интестиналног и дифузног типа карцинома постоје бројне различитости, како у хистолошком обрасцу раста, тако и у биолошком понашању. За дифузни тип још увек није сасвим прецизирана преканцерозна лезија, није дефинисан на основу хистогенезе (попут интестиналног типа) већ на основу начина раста. Састоји се од слабо кохезивних ћелија које дифузно инфилтришу желудачни зид и формира мало или нимало жезданих структура. Јавља се претежно код млађих пацијената, док је интестинални тип чешћи код старијих узрасних група. За разлику од интестиналних варијанти које показују тенденцију да метастазирају у јетру, дифузни тип се директно шири у перитонеум и суседне органе. Дифузни карциноми обухватају лезије са различитом прогнозом: од нискоградусних дезмопластичних типова без или са ретким ангио-лимфо-неуралним инвазијама, до високоградусних подтипова са анапластичним ћелијама, али други аутори истичу његову значајно лошију прогнозу у односу на интестинални тип посебно код млађих особа. Поред ових сазнања намеће се и кључно питање, како хронична *H.pylori* инфекција изазива тако различите клиничке исходе? Током *Correa* секвенце се дешавају поремећаји ћелијске пролиферације, диференцијације, адхезије и трансдукције сигнала са акумулацијом генетских алтерација, што води у канцерску трансформацију, а да би дошло до малигне трансформације потребна је активација и сарадња више онкогена. Један од онкопротеина који је спорадично испитиван у желудачној карциногенези је *Stathmin 1*, микротубуларни регулаторни протеин са важном улогом у монтажи и демонтажи деобног вретена. Експресија *Stathmin 1* у туморским ћелијама је повезана са њиховом пролиферацијом и метастазирањем. Високо је експримиран у широком спектру хуманих карцинома, па представља атрактивну мету за антитуморску терапију. Јеон и сарадници су недавно саопштили позитивну корелацију експресије *Stathmin 1* са метастазама, а негативну са дужином преживљавања код дифузног типа желудачног карцинома.

Ћелијска адхезија има важну улогу у регулацији раста, диференцијацији и миграцији ћелија. Кључну улогу у ћелијској адхезији и у одржавању нормалних структура ткива имају кадхерини. Ћелијски адхезиони молекул *E-cadherin* је идентификован као супресор туморске инвазије и метастазирања. Губитак *E-*

кадхеринских адхезионих молекула доводи до поремећаја цитоскелета, повећава се миграторна способност ћелија и омогућава њихово одвајање од тумора, што сугерише да промене у експресији Е-кадхерина могу бити значајан показатељ туморске прогресије. Редукција експресије Е-кадхерина сигнификантно је удружена са туморском инфилтрацијом, метастазама у лимфним нодусима и лошом прогнозом код карцинома желуца. Пролиферација ћелија је пропорционална туморском расту и прогресији, а најчешће коришћен маркер пролиферације је пролиферативни нуклеарни антиген- Ki67 који визуелизује не само ћелије у деоби већ и све оне у синтетичкој фази циклуса (у G1,S,G2 i M фази).

p53, осим улоге транскрипционог фактора и „чувара генома“ (зауставља репликацију оштећене ДНК), своју тумор супресорну активност испољава и кроз способност да модулише ћелијску миграцију. Губитак функције p53 повећава мотилитет ћелија што доприноси инвазивности тумора. Апоптоза је важан ниво контроле ткивне хомеостазе којом се елиминишу непожељне ћелије, а узрокована је деловањем p53. Ген bcl 2 са анти-апоптотичном функцијом је под нисходном регулацијом гена *Wild 53*. Доминација пролиферације над апоптозом обезбеђује раст и прогресију тумора. Постоји више доказа који подржавају хипотезу да изостанак апоптозе може бити важан фактор у еволуцији карцинома и лошег одговора на хемо-и радиотерапију.

**2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оргиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области** Прегледом референтне литературе прикупљене систематским претраживањем биомедицинских база података *Medline*, *ScienceDirect*, *EBSCO* и *KOBSON*, коришћењем следећих кључних речи: карцином желуца, Stathmin 1, пролиферација, апоптоза, адхезиони молекули и међусобним укрштањем сваке од наведених одредница са одредницом denture, нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа. На основу наведених чињеница комисија констатује да докторска дисертација кандидата Миљана Зиндовића под насловом „Компаративна анализа имунохистохемијске експресије Stathmina 1, E-cadherina, Ki-67, p53 и bcl2 у интестиналном и дифузном карциному желуца“, представља резултат оригиналног научног истраживања.

### **2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области**

#### **А) Лични подаци**

Др Миљан Зиндовић рођен је 23.06.1979. године. Медицински факултет у Крагујевцу уписао је школске 1998/1999. године, а завршио марта 2007. године и стекао звање доктора медицине. Након завршених студија обавио је обавезан приправнички стаж у ЈЗУ Дом здравља Подгорица и положио стручни испит. Од октобра 2008 године до марта 2012. године као доктор медицине је радио у Заводу за хитну медицинску помоћ Црне Горе. Специјалистичке студије из Опште хирургије уписао је марта 2012. године, а завршио јуна 2017. године. Као специјалиста опште хирургије запослен је на Хируршкој клиници Клиничког центра Црне Горе. Докторске академске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу уписао је школске 2007/2008. године.

Током рада обавио је усавшавања на: The American Austrian Foundation Salzburg Weill Cornell Seminar in Surgery, Salzburg September 2016., The American Austrian Foundation Salzburg Weill Cornell Seminar in Trauma & Emergency Surgery, Salzburg January 2015., 8th Biannual International Symposium of Coloproctology, Beograd, Oktobr 2012., Universita Karlova v Praze X International intensive Course „Bioethics at the Frontiers of Biomedicine“, Prague July 2006., о чему поседује следеће сертификате: Certificate of Seminar in Surgery, Certificate of Seminar in Trauma & Emergency Surgery Certificate of 8th Biannual International Symposium of Coloproctology School of Medicine University of Belgrade, Certificate of International intensive Course.

Током три године основних студија обављао је послове студента демонстратора на предмету патолошка анатомија. Тренутно је ангажован као сарадник у настави на предмету хирургија Медицинског факултета Универзитета Црне Горе.

Чита, пише и говори енглески језик и служи се италијанским језиком.

## Б) Списак објављених радова

Кандидат је аутор и коаутор следећих радова, чиме је испунио услов за пријаву докторске дисертације:

1. **Zindovic M**, Vuletic M, Milenkovic S, Jancic S, Krstic M, Zindovic D, Milosevic V. Clinical and pathological significance of proliferation index and p53 expression in gastric adenocarcinoma. J BUON. 2021;26(4):1466-1478. **M23**
2. Milosevic VS, Vukmirovic FC, Krstic MS, **Zindovic MM**, Lj Stojanovic D, Jancic SA. Involvement of leptin receptors expression in proliferation and neoangiogenesis in colorectal carcinoma. J BUON. 2015;20(1):100-8. **M23**
3. Jancic S, Bojanic V, Rancic G, Joksimovic I, Jancic N, **Zindovic M**, Stankovic V. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) - microadenomas of the thyroid gland induced by cadmium toxicity. Experimental study. J BUON. 2011;16(2):331-6. **M23**

### 2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Докторска дисертација Др Миљана Зиндовића се састоји из основног докторског рада који је написан на 147 страница, садржи 26 графикона, 3 колаж фотографије и 38 табела, насловне странице, апстракта на српском и енглеском језику и садржаја. Дисертација је целости написна на српском језику. Обухвата следећа основна поглавља: Увод, Преглед литературе, Циљ истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључак, Општи закључак и Литература. Поглавље литература садржи 362 цитиране библиографске јединице из иностраних научних и стручних публикација.

У уводном делу је кандидат, цитирајући релевантну литературу, изнео досадашња сазнања о патогенези желудачних карцинома и опште је прихваћеном моделу вишетапне карциногенезе, од *H.pylori* индукованог хроничног гастритиса преко мултифокалне атрофије, интестиналне метаплазије и дисплазије до карцинома, назване “Correa секвенца“ и бројне различитости између интестиналног и дифузног типа карцинома, како у хистолошком обрасцу раста, тако и у биолошком понашању. Такође, за дифузни тип још увек није сасвим прецизирана преканцерозна лезија, није дефинисан на основу хистогенезе (попут интестиналног типа) већ на основу начина раста. Сугерисано је да један од онкопротеина који је спорадично испитиван у желудачној карциногенези је Stathmin 1, микротубуларни регулаторни протеин са важном улогом у монтажи и демонтажи деобног вретена. Експресија Stathmina 1 у туморским ћелијама је повезан са њиховом пролиферацијом и метастазирањем. Јеоп и сарадници су недавно саопштили позитивну корелацију експресије Stathmina 1 са метастазама, а негативну са дужином преживљавања код дифузног типа желудачног карцинома. Ћелијски адхезиони молекули E-cadherin је идентификован као супресор туморске инвазије и метастазирања. Губитак E-кадхеринских адхезионих молекула доводи до поремећаја цитоскелета, повећава се миграторна способност ћелија и омогућава њихово одвајање од тумора. p53, своју тумор супресорну активност испољава и кроз способност да модулише ћелијску миграцију. Губитак функције p53 повећава мотилитет ћелија што доприноси инвазивности тумора. Апоптоза је важан

ниво контроле ткивне хомеостазе којом се елиминишу непожељне ћелије, а узрокована је деловањем p53.

Stathmin 1, је високо је експримиран у широком спектру хуманих карцинома, па представља атрактивну мету за антитуморску терапију. Редукција експресије E-cadherina сигнификантно је удружена са туморском инфилтрацијом, метастазама у лимфним нодусима и лошом прогнозом код карцинома желуца. . Постоји више доказа који подржавају хипотезу да изостанак апоптозе може бити важан фактор у еволуцији карцинома и лошег одговора на хемо-и радиотерапију.

Основни циљ ове студије је био испитивање утицаја експресије Stathmina 1 на адхезионе молекуле, пролиферацију и апоптозу у интестиналном и дифузном карциному желуца. У складу са овим постављено је више јасно дефинисаних циљева истраживања:

1. Испитивање дистрибуције интестиналног и дифузног карцинома желуца у односу на демографске карактеристике испитаника (старост и пол) и у односу на стадијум по ТНМ класификацији (величина примарног тумора, локална туморска инвазија, метастазе у регионалним лимфним жлездама и удаљене метастазе).
2. Анализа интестиналног и дифузног карцинома желуца у односу на локализацију у желуцу и у односу на хистопатолошке карактеристике (хистолошки градус, инвазија лимфатика, ангиоинвазија, перинеурална инвазија, дезмоплазија, инфламаторни инфилтрат и некроза).
3. Имунохистохемијско испитивање експресије Stathmin1, Ki67, p53, bcl2 и E-cadherina у интестиналном и дифузном карциному желуца и у суседном не-туморском ткиву.
4. Анализа корелације експресије Stathmin1 са пролиферативним индексом, E-cadherinom, експресијом p53 и индексом апоптозе у интестиналном и дифузном карциному желуца и суседном не-туморском ткиву.
5. Корелација имунохистохемијске експресије Stathmin1, Ki67, E-cadherina, bcl2 и p53 у интестиналном и дифузном карциному са класичним прогностичким параметрима (из горе наведених тачака 1 и 2).

У поглављу Материјал и методе детаљно су описане све спроведене методе, начин узорковања, дефинисање биопсијског и оперативног материјала, независне и зависне варијабле. Информације о хистопатолошком типу тумора, хистолошком градусу тумора, дубини инвазије, инвазији лимфатика, ангиоинвазији, перинеуралној инвазији, инфламаторном инфилтрату, дезмоплазији и некрози потврђене су на основу рутинске Хематоксилин-Еозин методе (H&E). Имунохистохемијска ABC метода са следећим примарним антителима: анти E-cadherin, анти Ki67 и анти stathmin1, анти p53 и анти bcl2- антителима, а као позитивне контроле коришћени су узорци инвазивног карцинома дојке, који су раније вишеструко тестирани и сигурно садрже испитиване антигене. Као негативна контрола за имунохистохемијско бојење били су узорци ткива третирано не имуним серумом уместо примарног антителя.

За одређивање вредности експресије Ki67, и p53 узимана је у обзир само пребојеност једара, за евалуацију експресије stathmin1 само пребојеност цитоплазме, а

E-cadherina ситнозрнасти жуто-браон депозити локализовани на ћелијским мембранама. Примењене су одговарајуће статистичке методе за процену експресије. Испитаници су подељени у две групе: они са ниским степеном експресије (вредности мање или једнаке вредностима медијане) и они са високим степеном експресије (вредности веће од вредности медијане).

Резултати истраживања су подељени у више поглавља која се односе на испитиване групе. Резултати су описани текстуално и систематично приказани на графиконима и табелама. Садрже дескриптивну макроскопску и микроморфолошку анализу интестиналног и дифузног карцинома желуца. Статистичку анализу демографских, клиничких и хистопатолошких карактеристика ова два типа карцинома. Имунохистохемијску експресију Stathmina 1, E-cadherina, Ki-67, p53 и bcl2 у туморима и околном не-туморском ткиву, као и вредности експресије ових маркера у туморима у односу на демографске и клиничко-патолошке параметре. Такође, дата је корелациона анализа клиничко-патолошких варијабли и експресије Stathmina 1, E-cadherina, Ki-67, p53 и bcl2 у туморима, уз граничну вредност Stathmina 1 и Ki-67 у дифузном карциному желуца.

Поглавље дискусија је написано систематично, стилски уобличено, наводећи преглед литературе са досадашњим научним истраживањима. Добијени резултати истраживања из ове докторске дисертације су јасно анализирани и поређени са релевантним литературним подацима истраживања других аутора из ове области .

На основу претходно изнетих чињеница Комисија закључује да завршена докторска дисертација кандидата Миљана Зиндовића под називом **Компаративна анализа имунохистохемијске експресије Stathmina 1, E-cadherina, Ki-67, p53 и bcl2 у интестиналном и дифузном карциному желуца**, по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми докторске дисертације.

## 2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултат истраживања ове докторске дисертације може бити формулисани тврдњом да код је дифузног карцинома пораст индекса експресије Stathmina 1 праћен повећаним пролиферативним индексом, редукцијом ћелијске адхезије, редукцијом апоптозе и порастом метастатског потенцијала, због чега овај онкопротеин може бити атрактивна терапијска мета у циљаној терапији дифузног карцинома желуца.

Такође, резултати сугеришу да поређењем дијагностичког значаја пролиферативног Ki67 антигена и микротубуларног протеина Stathmin 1, применом ROC анализе су потврђене њихове добре дијагностичке перформансе, уз извесну предност Stathmina 1 у односу на Ki67 код дифузног карцинома желуца.

Анализа резултата испитивања је показала:

- значајну, али слабу повезаност индекса експресије Stathmina 1, само са инвазијом крвних судова у интестиналном карциному, док у дифузном карциному је позитивним, највишим и високим коефицијентима корелације повезан са стадијумом тумора, метастазама у лимфним чворовима, инвазијом лимфних судова и хистолошким градусом тумора. Нешто слабија, али значајна

повезаност постоји између индекса експресије Stathmina 1 са инвазијом крвних судова и удаљеним метастазама.

- у интестиналном карциному слабу али значајну инверзну повезаност експресије E-cadherina са удаљеним метастазама, инвазијом крвних и лимфних судова, метастазама у лимфним чворовима и стадијумом тумора, док у дифузном карциному желуца значајну, јаку инверзну повезаност експресије са инвазијом лимфних судова, са метастазама у лимфним чворовима, стадијумом, хистолошким градусом тумора и локализацијом тумора.
- да је индекс експресије тумор супресор протеина p53 сигнификантно повезан само са хистолошким градусом тумора у интестиналном карциному, док у дифузном карциному желуца осим повезаности са хистолошким градусом, јаке значајне везе постоје и између индекса експресије p53 и инвазије лимфних судова, метастаза у лимфним чворовима и стадијума туморске болести.
- да је експресија анти-апоптотичног онкопротеина Bcl-2 карактеристична по значајним инверзним везама са инвазијом лимфних и крвних судова, метастазама у лимфним чворовима, стадијумом и хистолошким градусом тумора код интестиналног карцинома, а да у дифузном карциному желуца постоји високо значајна, такође инверзна, повезаност експресије са инвазијом лимфних и крвних судова, метастазама у лимфним чворовима, стадијумом и хистолошким градусом тумора.
- у интестиналном карциному желуца слаб степен међусобне повезаности индекса пролиферације са осталим испитиваним маркерима, док у дифузном карциному желуца, сви испитивани маркери су у међусобном односу који је сигнификантан, али је најочљивија висока и сигнификантана међусобна зависност између индекса пролиферације експресије Ki67 и индекса експресије Stathmina 1.

## 2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

На основу добијених резултата истраживања моћи ће боље да се сагледају сличности и разлике у адхезионим везама, пролиферативном и апоптотском индексу између интестиналног и дифузног карцинома желуца, што ће делимично разјаснити неке фенотипске разлике које постоје између ова два субтипа желудачног карцинома. Такође, моћи ће боље да се сагледа утицај експресије Stathmina 1 на експресију Ki67, E-cadherina, p53 и bcl 2 у интестиналном и дифузном карциному желуца. Добијене вредности би се даље користиле за одређивање прогностичког значаја експресије Stathmin1 у односу на пролиферативни, апоптотски индекс и на адхезионе везе, као и у односу на класичне клиничке прогностичке параметре тумора. Такође, издвајање болесника са повишеним ризиком за прогресију болести, би било од значаја за постоперативни третман ових пацијената и примену индивидуалног антитуморског третмана, антагонистом Stathmina 1.



## **2.7. Начин презентирања резултата научној јавности**

Резултати ове студије су једним делом публиковани у часопису индексираном на SCI листи (категорија M23):

1. **Zindovic M, Vuletic M, Milenkovic S, Jancic S, Krstic M, Zindovic D, Milosevic V.** Clinical and pathological significance of proliferation index and p53 expression in gastric adenocarcinoma. JBUON 2021; 26(4): 1466-1478 **M23**

## ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Миљана Зиндовића под називом „Компаративна анализа имунохистохемијске експресије *Stathmina 1*, *E-cadherina*, *Ki-67*, *p53* и *bcl2* у интестиналном и дифузном карциному желуца“, сматра да је истраживање у оквиру ове тезе засновано на актуелним сазнањима и да је адекватно реализовано према прецизно постављеној методологији.

Комисија сматра да докторска дисертација представља оригинални научни допринос од научног и практичног значаја за прогнозу и постоперативни третман оболелих од карцинома желуца, адекватно и прецизно планирање терапије, уз примену индивидуалног антитуморског третмана, антагонистом *Stathmina 1*.

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом: „Компаративна анализа имунохистохемијске експресије *Stathmina 1*, *E-cadherina*, *Ki-67*, *p53* и *bcl2* у интестиналном и дифузном карциному желуца“ кандидата Миљана Зиндовића, буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

**Проф. др Драгче Радовановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник;

---

**Проф. др Филип Вукмировић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Подгорици за ужу научну област Патологија, члан;



---

**Проф. др Наташа Здравковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Интерна медицина, члан;



---

У Крагујевцу, март 2022.