

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВАЦ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

1. Одлука Наставно – научног већа Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, одржаној дана 29.10.2014. године, одлуком 01-11320/3-19 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називо,, **Корелација експресије лептин рецептора са пролиферацијом, неоангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному**“ кандидата Мр.сци.мед.др Велимира Милошевића, у следећем саставу:

- 1.Проф. др Милан Кнежевић**,редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка анатомија, председник;
- 2. Доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;
- 3.Доц. др Милутин Булајић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Интерна медицина, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Мр.сци.мед.др Велимира Милошевића и подноси Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

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

Докторска дисертација кандидата Мр.сци.мед.др Велимира Милошевића под називом **„Корелација експресије лептин рецептора са пролиферацијом, неоангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному“**, урађена под менторством Доц. др Миљана Крстића, доцента Медицинског факултета Универзитета у Нишу, за ужу научну област Патолошка анатомија, представља оригиналну студију која се бави испитивањем повезаности експресије лептин рецептора са пролиферацијом, густином микроциркулације и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному. Ова студија представља оригинално истраживање из области патоанатомије, патофизиологије, онкологије и гастроентерологије и базирана је на значајној и интересантној проблематици везаној за утицај лептин/лептин рецептора на неоангиогенезу, муцинску секрецију и раст карцинома колона.

Без обзира на значајна сазнања о етиопатогенези колоректалног карцинома, још увек није сасвим дефинисано због чега гојазне особе имају 1,5-3,5 пута већи ризик за настанак колоректалног карцинома. Кључни молекул у развоју гојазности је лептин, продукт Об гена који је локализован на дужем краку хромозома 7 (7q31), који испољава своје деловање кроз специфичне рецепторе који припадају првој класи рецептора цитокинске фамилије. Експресија лептин рецептора је откривена у многим ткивима, при чему је запажено да лептин има стимулативни ефекат на пролиферацију малигнућ ћелија тумора различитих локализација. Поред тога лептин има важну улогу у ангиогенези, инвазији и метастазирању.

Одавно је запажено да осим неконтролисана пролиферације и неоангиогенезе током колоректалне карциногенезе настају и алтерације у структури и/или количини епителних муцина које узрокују промене како баријерне функције мукуса, тако и поремећај ћелијске сигналне трансдукције. Ове промене у муцинској експресији утичу на ћелијски раст, диференцијацију, адхезију и инвазивност. Међутим, у литератури готово да нема података о повезаности експресије лептин рецептора са муцинском секрецијом.

Докторска теза кандидата својим дизајном је омогућила боље разумевање појединих механизма којима лептин/лептин рецептор утиче на пролиферацију, ангиогенезу и муцинску секрецију у колоректалном карциному.

2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Прегледом литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података „PubMed“, „Medline“, „KoBSON“, „SCIndeks“ помоћу кључних речи „leptin receptor“, „colorectal carcinoma“, „colorectal mucins“, „angiogenesis“, не наилази се на студије сличног дизајна и методолошког приступа. У наведеним базама

података не постоје публиковане студије које су испитивале повезаност експресије лептин рецептора са хистохемијском експресијом муцина у колоректалном карциному.

На основу тога Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Мр.сци.мед. др Велимира Милошевића, под називом „**Корелација експресије лептин рецептора са пролиферацијом, неоангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному**“ представља резултат оригиналног научног рада, а оригиналност ове студије се огледа у томе што је први пут показана значајна повезаност експресије лептин рецептора са муцин-хистохемијским алтерацијама у колоректалном карциному.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

Мр.сци.др Велимир Милошевић је рођен 13.3.1975 у Подгорици, где је са одличним успехом завршио основну школу и Гимназију. Медицински факултет је завршио 2000.год. у Београду са просечном оценом 9,3. Академске магистарске студије је завршио на Факултету медицинских наука у Крагујевцу и успешно одбранио магистарски рад 2005 год. Специјалистички испит из Интерне медицине је положио јуна 2006 год у Београду, са највећом оценом. Субспецијализацију из Гастроентерохепатологије је завршио на Медицинском факултету у Београду октобра 2008 год. Годину 2011 је провео у Риму у Поликлиници Gemelli, где је у «hands on training» програму обучен за извођење ендоскопске ретроградне холангиопанкреатографије (ЕРЦП) и других напредних ендоскопских метода под менторством професора Гвида Костамање (Guido Costamagna)

Запослен је на одељењу Гастроентерохепатологије КЦЦГ, а поред тога др Милошевић је и сарадник у настави на Медицинском факултету Универзитета у Подгорици, за ужу научну област Интерна медицина. Течно говори енглески и италијански језик. Ожењен је, отац кћерке Софије.

Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

Научни радови објављени у целини у часописима :

1. **Milošević VS**, Vukmirović F, Jančić S, Smolović B, Knežević V, Đuranović SP: Correlation between endoscopy, pathohistology and quality of life in patients with of gastroesophageal reflux disease-single center experience from Montenegro. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 2011; 11(1):S86-S89 (M23= 3 бода)

2. **Milošević VS**, Vukmirović FČ, Miljan S, Krstić MS, Zindović MM, Stojanović D, Jančić SA: Involvement of leptin receptors (LEPR) expression in proliferation and neoangiogenesis in colorectal carcinoma. *J. BUON*, 2015, vol 20(1): *In press* (M23= 3 бода)

3.Zindović M, Milošević V, Žujović J, Vučković LJ, Kujović A i Lazović R: A rare giant extra-gastrointestinal stromal tumor (GIST) in young male patient. Acta Medicae Medianae; 2014, vol 53 (4) : *In press* (M52 = 1,5бода)

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

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Циљеви истраживања идентични су са одобреним у пријави тезе. Примењена методологија истраживања идентична је са одобреном.

Докторска дисертација Мр.сци.мед.др Велимира Милошевића под називом **„Корелација експресије лептин рецептора са пролиферацијом, неангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному“** садржи следећа поглавља: *Увод, Преглед литературе, Циљ истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључак и Литература*. Рад садржи 45 табеларних приказа, 21 графикон и 22 слике, а у поглављу *Литература* адекватно је цитирано 323 референци из савремене домаће и иностране литературе.

У уводном делу кандидат укратко разматра садашњи ниво сазнања о испитиваној теми и о значају изабране теме за медицинску науку, затим истиче непознанице о теми и повезује их са темом свог рада.

У поглављу *Преглед литературе*, кандидат је позивајући се на савремене литературне податке јасно и прецизно изложио досадашња сазнања о етиологији, патогенези, клиничким и хистопатолошким карактеристикама колоректалног карцинома. Такође су у овом поглављу изнета и савремена сазнања о улози лептина и лептин рецептора како у физиолошким, тако и у патолошким условима. Поред тога овде је свеобухватно и исцрпно теоријски разматрана улога епителних муцина у колоректалној карциногенези.

У *Циљу истраживања* јасно су изложени конкретни задаци, при чему је основни циљ испитивање повезаности експресије лептин рецептора са експресијом маркера пролиферације (Ki67), неангиогенезе (CD105) и секрецијом муцина у аденокарциному колона. У складу са овим основним циљем постављени су следећи задаци: анализа експресије лептин рецептора у исечцима ткива аденокарцинома колона и корелација те експресије са класичним прогностичким параметрима; квалитативна и семиквантитативна хистохемијска анализа секреције неутралних- фукомуцина, слабо коселих-сијаломуцина и јако-киселих сулфомуцина и корелација ових вредности са експресијом лептинских рецептора; анализа експресије маркера пролиферације Ki67 у туморском ткиву, анализа маркера неангиогенезе ендоглина (CD105) у туморском ткиву и перитуморској строми и корелација ових вредности са експресијом лептинских рецептора.

Материјал и методе истраживања подударни су са наведеним у пријави докторске дисертације и презентовани су на одговарајући начин. Истраживање је обављено у виду ретроспективне клиничко-експерименталне студије. За истраживање је коришћен биопсијски, оперативни материјал Хируршке клинике Клиничког Центра Црне Горе (КЦЦГ) добијен ресекцијом колоректалног тумора у периоду од јануара 2010. до децембра

2012.године. Материјал је рутински обрађиван и калушљен у парафин.Са парафинских блокова 75 оперисаних болесника, су прављени резови дебљине 3-4 μ m.На ткивним пресецима су, након депарафинисања примењене рутинска Хематоксилин-Еозин метода (H&E) (на основу које се добијају информације о хистопатолошком типу тумора, хистолошком градусу тумора, дубини инвазије, инвазији лимфних судова, ангиоинвазији, перинеуралној инвазији, инфламацијском инфилтрату, дезмоплазији и некрози), хистохемијска АВ-PAS (Alcian Blue-Periodic Acid Schiff) метода за диференцијацију неутралних од киселих муцина, хистохемијска НID-AB (pH 2,5) (High Iron Diamine-Alcian Blue) метода за диференцијацију слабо киселих, интестиналних-сијаломуцина, од јако киселих, колонских-сулфомуцина при чему сијаломуцине АВ pH 2,5 боји тиркизно плаво, док сулфатиране муцине НID боји браон до црно и мунохистохемијска ABC метода саанти-лептин рецептор, анти-Ki67 и анти- CD105 антителима.

За статистичку обраду добијених резултата коришћен је комерцијални програмски пакет SPSS (верзија 13.0). Статистичка обрада резултата је обухватила методе дескриптивне статистике, а у приказу резултата коришћене су мере централне тенденције и мере варијабилитета у складу са типом расподеле. Добијени подаци обрађени су и приказани на табелама и графиконима као процентуална вредност појединих категорија. У процесу тестирања хипотезе као гранични ниво статистичке значајности коришћена је вредност $p < 0.05$ и $p < 0.1$. Нормалност расподеле евалуирана је Kolmogorov-Smirnov тестом. Поред униваријантне статистичке анализе, рађена је и анализа сигнификантности разлика параметарских и непараметарских обележја, између и унутар група, применом χ^2 - теста (Ни-квadrat тест), Mann-Whitney U- теста, Kruskal Wallis– теста и Studentov-ог t- теста. Зависност између две нумеричке променљиве испитивана је помоћу Spearmanov-ог коефицијента корелације ранга и Pearsonov-ог коефицијента корелације за параметарска обележја. Помоћу ROC (Receiver Operating Characteristic) анализе је испитивана могућност да нека променљива буде маркер и опредељена гранична вредност за испитиване маркере.

Резултати истраживања су систематично приказани и добро документовани са 38 табела, 21 графиконом и 22 фотографије. Показано је да је експресија лептин рецептора високо значајним и високо позитивним коефицијентима корелације повезана са индексом експресије нуклеарног пролиферативног антигена (proIDX) и индексом неоангиогенезе (mvdIDX). Такође је показано да постоји значајна веза између експресије лептин рецептора и хистохемијске експресије слабо киселих-сијаломуцина. Повећање експресије лептин рецептора је високо значајним позитивним коефицијентом корелације повезано са хиперсекрецијом сијаломуцина. Продукција сијаломуцина је високо значајним, позитивним коефицијентом корелације повезана са пролиферацијом и неоангиогенезом. Експресија лептин рецептора је умерено високим и статистички значајним коефицијентом корелације повезана са секрецијом неутралних-фукомуцина. Фукомуцини су у односу на сијаломуцине слабијим али статистички значајним коефицијентом корелације у вези с са пролиферацијом и неоангиогенезом. Такође статистички значајним, али негативним коефицијентом корелације је лептин рецептор експресија у вези са секрецијом јако киселих сулфомуцина.

У овој тези је такође показано да је експресија лептин рецептора статистички високо значајним коефициентима корелације повезана са стадијумом тумора по Astler Coller класификацији, са метастатстазама захваћеним лимфним чворовима, са инвазијом лимфатика, перинеуралном инвазијом и удаљеним метастазама.

У поглављу *Дискусија* представљена је анализа добијених резултата и њихово поређење са литературним подацима из ове области. Коментари добијених резултата су језгровити, а начин приказивања података чини их прегледним и разумљивим. Резултати су дискутовани у контексту контрадикторних ставова о утицају лептин рецептора на клиничко-патолошке особине колоректалног карцинома, на алтерације епителних муцина, на индекс пролиферације и на густину туморских крвних судова. При томе су наведени ставови из најзначајнијих оригиналних и ревијских научних радова поменуте области.

У *Закључку* је, поред осталог, истакнуто да је пораст експресије лептин рецептора праћен повећањем пролиферативне активности, повећаном неоангиогенезом, аберацијама у муцинској продукцији и порастом метастатског потенцијала колоректалног аденокарцинома.

Литература је адекватна по обиму и садржини. Цитиране су 323 библиографске јединице из домаћих и иностраних стручних публикација

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација под насловом **“Корелација експресије лептин рецептора са пролиферацијом, неоангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному”**, по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања садржани су у следећим закључцима:

1. Инциденца колоректалног аденокарцинома није повезана са узрастом и полом испитаника
2. Најчесталија локализација колоректалног аденокарцинома је ректум и најчешће се презентује као улцероинфилтративна промена.
3. Највећи број колоректалних аденокарцинома је дијагностикован као умерено диферентован (G2) тип и класификован у T3 стадијум.
4. Лимфогене метастазе су нађене у више од половине испитаника, што корелира са налазом инвазије лимфатика, док су метастазе у јетри нађене знатно ређе- код сваког десетог пацијента, што је у корелацији са венском ангиоинвазијом.
5. Највећи број испитиваних колоректалних аденокарцинома је без или са слабо израженом дезмопластичном реакцијом, док је слабо изражена некроза присутна у око $\frac{3}{4}$ испитиваних тумора.
6. Највећи број испитиваних тумора се налазио у C2 стадијуму, по Astler Coller-овој класификацији

7. Експресија лептин рецептора је верификована у сигнификантном броју случајева (у преко 3/4 испитиваних колоректалних аденокарцинома)
8. Умерена и изражена секреција сијаломуцина у колоректалном аденокарциному је нађена у преко 4/5 испитаника, док се сијаломуцини у не-туморској мукози колоректума најчешће продукују у трагу.
9. У највећем броју колоректалних аденокарцинома је присутна асекреција фукомуцина, док је секреција сулфомуцина најчешће присутна у трагу.
10. Хиперсекреција сијаломуцина сигнификантно корелира са повећањем експресије лептин рецептора у колоректалном аденокарциному
11. Експресија лептин рецептора значајно позитивно корелира са пролиферативном активношћу и неоангиогенезом у колоректалном аденокарциному
12. Експресија лептин рецептора је сигнификантно повезана са метастатским потенцијалом колоректалног аденокарцинома

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Презентовани резултати истраживања дају оригинални допринос бољем разумевању утицаја експресије лептин рецептора на колоректалну карциногенезу. Високо статистички сигнификантна корелација експресије лептин рецептора са индексом пролиферације, индексом микроваскуларне густине и муцинохистохемијском експресијом слабо киселих-сијаломуцина указује да експресија лептин рецептора може бити индикатор туморске прогресије колоректалног карцинома.

Истовремено, ови резултати, указују на могућу нову стратегију антитуморског третмана применом антагониста лептин рецептора у постоперативном третману колоректалног карцинома.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати истраживања који се односе на утицај експресије лептин рецептора на пролиферацију и неоангиогенезу у колоректалном карциному су прихваћени за публикување у часопису од међународног значаја, а планирано је да остали резултати овог истраживања такође буду публикувани као оригинално истраживање у часопису од међународног значаја, односно презентовани на научним и стручним скуповима у форми усмене или постер презентације.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Мр.сци.др Велимира Милошевића под називом **“Корелација експресије лептин рецептора са пролиферацијом, неоангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному”** на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру дисертације засновано на савременим научним сазнањима и да је адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Велимира Милошевића урађена под менторством Доц. др Миљана Крстића представља оригинални научни рад и има велики научни и практични значај у разумевању утицаја различитих прокарциногених фактора и регулаторних механизма у колоректалној карциногенези.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом **“Корелација експресије лептин рецептора са пролиферацијом, неоангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному”** кандидата Мр.сци.др Велимира Милошевића буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф.др Милан Кнежевић-председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија

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

Доц.др Милутин Булајић-члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина
