

Оцену готове докторске тезе,
доставља,-

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ
ФАКУЛТЕТА ВОЈНОМЕДИЦИНСКЕ АКАДЕМИЈЕ

На 23. Седници Наставно-научног већа ВМА, одржаној 30.10.2014.год. одређена је комисија за оцену готове докторске тезе ппук асист. мр сц мед Миломира Гачевића из Клинике за пластичну хирургију и опекотине ВМА чија тема гласи:

„ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ВАСКУЛАРНОГ ЕНДОТЕЛНОГ ФАКТОРА РАСТА ЗА ПРОГНОЗУ И ТОК БОЛЕСТИ КОД БОЛЕСНИКА СА ПРИМАРНИМ КУТАНИМ МЕЛАНОМОМ”.

Након увида у достављени материјал и разговора са кандидатом, комисија у саставу:

ВС проф др сц мед **Данило Војводић**, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; ппук доц др сц мед **Ненад Степић**, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; ВС проф др сц мед **Весна Шуљагић**, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; ВС доц др сц мед **Жељко Мијужковић**, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; проф др сц мед **Дејан Опрић**, Медицински факултет Универзитета у Београду, подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација је написана на 188 страна и подељена на следећа поглавља: Увод (30 страна), Хипотеза и циљеви истраживања (4 стране), Материјал и методе истраживања (3 стране), Резултати (83 стране), Дискусија (39 страна), Закључци (3 стране) и Литература (24 стране). Резултати су документовани са 84 табела и 83 графикона. У раду је цитирано 297 радова.

2. Увод, хипотеза и циљеви истраживања

Тема истраживања овог рада је утврђивање значаја локално и системски продукованог васкуларно ендотелног фактора раста у ткивним узорцима хируршких ресектата примарних меланома и метастаза болесника са кутаним меланомом.

У **Уводу** кандидат наводи досадашња сазнања која указују на малу стопу петогодишњег преживљавања (5-20%) пацијената у III и IV клиничком стадијуму, због изузетне отпорности ћелија меланома на постојеће поступке хемио и радиотерапије. Иако хируршка ресекција тумора у најранијој фази болести (*melanoma in situ*) доводи до излечења, лечење пацијената са метастатским меланомом представља велики клинички проблем. Бројне генетске, имунолошке и клиничке студије усмерене су на дефинисање нових биомаркера као позданих показатеља предикције и прогнозе, или на проналажење средстава и/или процедура који би повећали хемосензитивност, индуковали апоптозу и смањили пролиферативни и метастатски потенцијал меланомских ћелија

Ангиогенеза игра значајну улогу у прогресији и метастазирању меланома. Малигне ћелије могу да стимулишу раст нових крвних судова из предходно створених капилара, или васкулогенезу, којом се мобилишу ендотелне ћелије из косне сржи. Васкуларизација у туморском ткиву је патолошка. Крвни судови су пропусни, дилатирани и граде мрежу насумично повезаних крвних судова. Неоваскуларизација има двоструки ефекат на туморски раст: перфузијом снабдева тумор потребним нутритиентима и кисеоником а ново формиране ендотелне ћелије стимулишу раст оближњих туморских ћелија секрецијом фактора раста. Туморска ангиогенеза је контролисана балансом између ангиогених фактора и инхибитора ангиогенезе. Хипоксија је један од физиолошких стимулуса који повећавају продукцију различитих проангиогених цитокина, као што је васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF). Због овако важне улоге ангиогенезе у туморском расту многа истраживања су фокусирана на идентификовање ангиогених медијатора који се различито испољавају у бенигним или малигним ткивима и последично на анти-ангиогенезну терапију.

Последњих година интензивно се испитује улога VEGF-а у метастазирању меланома. VEGF и аутокринно и паракрино стимулише туморску ангиогенезу. Показано је да VEGF луче меланомске ћелије и стромалне ћелије, макрофаги и фибробласти. У литератури су изузетно ретки подаци који повезују локалну експресију VEGF у ткивним узорцима меланома са серумским вредностима истих болесника, као ни евентуалну повезаност локализације примарног меланома и начина ширења болести са експресијом VEGF. Иако се примарним прогностичким факторима сматрају дебљина меланома (по Breslow-у), присуство улцерације и статус „sentinel“ лимфних чворова, последњих година објављене су студије које говоре у прилог тврдњи да је анатомска локализација примарног тумора прогностички фактор независан од статуса „sentinel“ лимфних чворова и тока болести.

Из свега наведеног кандидат је поставио следеће **хипотезе**:

I Испољаванње VEGF-а значајно је веће у узорцима туморског ткива болесника са меланомом у односу на болеснике са бенигним пигментним лезијама коже, а мање него у болесника са метастазама.

II Степен експресије VEGF-а у меланомском ткиву и концентрација VEGF-а у серуму се разликују у односу на анатомску локализацију и патохистолошки тип меланома и корелирају са клиничко-лабораторијским показатељима прогресије болести код болесника са меланомом.

За проверу поставки хипотеза кандидат је дефинисао следеће **циљеве истраживања**:

Одредити серумске концентрације VEGF-а и степен експресије VEGF-а имунохистохемијски у ткивним узорцима меланомских лезија болесника. Упоредити просечне концентрације VEGF-а у групама са различитим клиничким стадијумима. Корелирати добијене серумске вредности VEGF са налазом испољаванња VEGFа у узорку тумора. Корелирати добијене резултате са клиничко лабораторијским показатељима тока и прогресије болести.

Утврдити разлике у туморској експресији и серумској концентрацији VEGF-a у односу на анатомску локализацију, величину тумора, присуство улцерације, присуство регресије, хистолошки тип меланома, облик ћелија, присуство митоза, степен васкуларне инвазије, присуство микросателитоза, присуство тумор инфилтришућих лимфоцита.

Утврдити да ли се иницијална експресија VEGF и иницијална концентрација VEGF-a у серуми могу повезати са DFI (дужином временског интервала без прогресије болести).

Утврдити да ли се иницијална експресија VEGF и иницијална концентрација VEGF могу повезати са путем ширења метастаза (утврдити начин ширења метастаза лимфогени-хематогени у односу на анатомску локализацију и експресију VEGF-a).

Утврдити да ли се иницијална експресија VEGF-a и иницијална концентрација VEGF-a могу повезати са исходом болести.

Утврдити степен експресије VEGF-a и серумске вредности VEGF-a у узорцима контролних особа.

3. Кратак опис постигнутих резултата

У поглављу **Метод рада и испитаници** представљен је дизајн испитивања –тип студије: Проспективна студија.

Истраживање је обављено у Институту за медицинска истраживања, Клиници за пластичну хирургију и опекотине, Клиници за кожне и полне болести и Институту за патологију и судску медицину Војномедицинске академије.

Студијом је обухваћено 127 испитаника старости од 20 до 65 година подељених у три групе. Прву групу је чинило 87 пацијената са дијагностикованим кутаним меланомом (22 пацијента у I, 18 у II, 27 у III и 20 у IV клиничком стадијуму болести), другу групу двадесет пацијената са диспластичним невусима и трећу групу двадесет пацијената са бенигним пигментним лезијама. Дијагноза меланома је постављена на основу клиничког и дерматоскопског прегледа дерматовенеролога, прегледа хирурга пластичара и патохистолошке анализе пигментне промене, а клинички стадијум болести је утврђен на

основу стандарних процедура за меланом (лабораторијске анализе укључујући LDH, Rtg плућа и срца, ултразвучног прегледа врата, аксила, препона, мале карлице и абдомена, а за појединачне пацијенте и СТ главе, грудног коша и мале карлице). Критеријуми за искључивање из студије су били: меланом ока и слузокоже, присуство других малигнитета и трудноћа. У првој групи сваком пацијенту са сумњивом пигментном лезијом је урађен дермоскопски преглед. Преоперативно су узети узорци крви за одређивање серумских вредности VEGF-a. Промене су хируршки одстрањене и патохистолошки верификоване. Класификацијом по Clark-у је одређен ниво инвазије, класификацијом по Breslow-у дебљина промене и TNM класификацијом хистолошки и клинички стадијум болести. Степен експресије VEGF-a је утврђен имунохистохемијски у ткивним узорцима хируршких ресектата примарног тумора и метастаза и ELISA тестом у узорцима серума пацијената узоркованих иницијално и након 1, 3, 6 месеци и годину дана након операције примарног тумора.

У **Статистичкој обради података** поред тестирања уобичајених дескриптивних параметара (средња вредност, стандардна девијација, медијана, стандардна грешка, 95% границе поверења и фреквенције појаве обележја), тестирање разлика учињено је коришћењем непараметријских тестова (*Wilcoxon*, *Mann-Whitney*) и једносмерне анализе варијансе (*Anova test* са *Bonferroni* пост тестирањем). Значајност, смер и интезитет међусобних условљености тестирани су применом *Spearman* корелационе анализе. Минимална статистичка значајност утврђена је на нивоу $p < 0.05$. Статистичке анализе учињене су коришћењем GraphPad Prism софтвера верзије 5.0.

Добијени **резултати** су показали да је најинтензивнија ткивна експресија и највећи број *VEGF+* ћелија детектован у узорцима примарног тумора болесника са IV и почетним (I) клиничким стадијумом, а да су серумске концентрације VEGF биле највеће у узорцима болесника са IB и IIIB стадијумом. У односу на хистолошки стадијум примарног тумора највећи степен експресије и највећи број *VEGF+* ћелија детектован је у болесника са T2a и T3b стадијумом а серумска концентрација VEGF била је највећа у узорцима болесника са Ib стадијумом. Када се анализира анатомска локализација примарног тумора, у узорцима примарних тумора локализованих на рукама није детектована експресија *VEGF*

ћелија детектован у узорцима примарних тумора локализованих на глави. У узорцима примарних тумора који су имали хематогени и лимфогени тип дисеминације детектована је најинтензивнија експресија *VEGF*, највећи број *VEGF+* ћелија и највећи пораст серумске концентрације *VEGF* у серијским узорцима. Између узорака примарних тумора различитих хистолошких типова није било значајне разлике у интензитету *VEGF* као ни у броју *VEGF+* ћелија. Серумске концентрације болесника са различитим хистолошким типовима тумора нису се значајно разликовале. У примарним меланомима са највећим бројем митоза детектован је највећи степен експресије *VEGF* и највећи број *VEGF+* ћелија. Насупрот овом налазу највећа серумска концентрација *VEGF* детектована је у болесника у чијим је примарним туморима нађен умерен број митоза. Степен експресије *VEGF* и број *VEGF+* ћелија није се разликовао између болесника који нису имали и оних који су имали присутну васкуларну инвазију. Интензивна инфилтрација примарног тумора лимфоцитима била је повезана са најмањим степеном експресије *VEGF* и најмањим број *VEGF+* ћелија, као и са најнижом серумском концентрацијом *VEGF*. Између узорака примарног тумора различитог Breslow скорa није било разлике у интензитету експресије *VEGF* као ни у броју *VEGF+* ћелија. Такође, серумске концентрације *VEGF* болесника са различитим Breslow скором нису се разликовале. Најинтензивнија ткивна експресија и највећи број *VEGF+* ћелија детектован је у узорцима примарног тумора болесника са Clark скором III а најнижа у групи са Clark скором V. Серумске концентрације *VEGF* болесника са различитим Clark скором нису се разликовале. Између узорака примарног тумора са улцерацијом и оних без ње није било разлике у интензитету експресије *VEGF* као ни у броју *VEGF+* ћелија. Такође, серумске концентрације *VEGF* болесника са улцерацијом или без ње нису се разликовале. Између узорака примарног тумора са присутном регресијом и оних са одсутном регресијом није било разлике у интензитету експресије *VEGF*, као ни у броју *VEGF+* ћелија и серумским концентрацијама *VEGF*. Вредности степена ткивне експресије *VEGF* у болесника без присутних меланофага у тумору су биле највеће у групи са фокалном дистрибуцијом и великим бројем меланофага у тумору (3+). Степен експресије *VEGF* и број *VEGF+* ћелија није се разликовао између болесника са метастатским меланомом и болесника без дисеминованог тумора. Вредности серумске концентрације *VEGF* и пораста серумске концентрације *VEGF* у серијским узорцима биле

Комисија једногласно предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, обзиром да су испуњени сви законски услови за јавну одбрану докторске тезе, да извештај прихвати и одобри јавну одбрану докторске дисертације под називом: **Значај експресије васкуларног ендотелног фактора раста за прогнозу и ток болести код болесника са примарним кутаним меланомом**”.

У Београду

09.11.2014.

КОМИСИЈА

1. ВС проф др сц мед Данило Војводић
 2. Ппук доц др сц мед Ненад Степић
 3. ВС проф др сц мед Весна Шуљагић
 4. ВС доц др сц мед Жељко Мијушковић
 5. Проф др сц мед Дејан Опрић
-