

Na osnovu Odluke Vijeća Medicinskog fakulteta o formiranju Komisije za doktorske studije, broj: 392/7 od 21.02.2019. godine a u skladu sa tačkom 3.5 Vodiča za doktorske studije UCG-Centar za doktorske studije, nakon razmatranja ispunjavanja uslova za prijavu teme doktorske disertacije i poštujući princip kopetentnosti, Komisija za doktorske studije dostavlja Vijeću Medicinskog fakulteta

INICIJALNI PRIJEDLOG
sastava Komisije za ocjenu prijave doktorske disertacije

1. Kandidat: **dr med Marko Vuković**

2. Tema istraživanja: **«Biomarkeri kod karcinoma beške: Kliničko-patološki i prognostički značaj ekspresije Ki-67»**

3. Komisija za ocjenu prijave doktorske disertacije:

- **Prof. dr Filip Vukmirović**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, predsjednik
- **Prof. dr Miodrag Aćimović**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu - mentor
- **Prof. dr Vladimir Todorović**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, član

MEDICINSKI FAKULTET
Komisija za doktorske studije

Prof. dr Filip Vukmirović





UNIVERZITET CRNE GORE
MEDICINSKI FAKULTET
06.07.2023
Primjerak:
Org. ispr. Broj Prilog Vrijednost
med 975

UNIVERZITET CRNE GORE

Obrazac PD: Prijava teme doktorske disertacije

PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Dr.med spec. Vuković Marko
Fakultet	Medicinski fakultet
Studijski program	Medicina
Broj indeksa	10/12
Ime i prezime roditelja	Milan Vuković
Datum i mjesto rođenja	09.05.1987, Podgorica
Adresa prebivališta	Bracana Bracanovica 88, 20000 Podgorica
Telefon	069 498 879
E-mail	Marko.vukovic09@gmail.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	2022-2023: Subspecijalizacija (fellowship) iz oblasti Urološke onkologije na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Tübingenu, Njemačka (položio sa odličnom ocjenom). 2015-2020: Specijalizacija iz oblasti Urologije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Srbija (položio sa odličnom ocjenom); 2006-2012: Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore (diplomirao sa prosječnom ocjenom 9.68 (A)) ; 2002-2006: Gimnazija: 'Slobodan Škerović', Podgorica (prosječna ocjena 4.93) 1994-2002: Osnovna škola: "Milorad –Musa Burzan, Podgorica (prosječna ocjena 5.00)
Radno iskustvo	Od 2021: Urolog na Klinici za urologiju, KCCG, Podgorica; 2015-2020: specijalizant na Klinici za urologiju KCCG; 2012-2015: rad u HMP Podgorica, volonterski ran na Klinici za Neurohirurgiju KCCG, Podgorica
Popis radova	1. Vukovic M, Chamlati J.M, Hennenlotter J, et al. Prognostic impact of the Interleukin-1-Beta/ Interleukin -1-Receptor –Antagonist axis in bladder cancer. Eur Urol. 2023; https://doi.org/10.1016/S0302-2838(23)01216-2

Obrazac PD: Prijava teme doktorske disertacije

2. Djordjevic D, Dragicevic S, **Vukovic M**. Mini-laparotomy radical cystectomy with limited bowel externalization during ileal conduit urinary diversion reduces the rate of postoperative complications: A matched-paired, single centered analysis. *Acta Chir Belg.* 2021; DOI:10.1080/00015458.2022.2025724.
3. Djordjevic D, Dragicevic S, **Vukovic M**. Technique selection of ureteroileal anastomosis in hautman ileal Neobladder with chimney modification: Reliability of patient-based selection strategy and its impact on ureteroenteric stricture rate. *Arch Ital Urol Androl.* 2021; 93:262-267
4. Djordjevic D, Dragicevic S, **Vukovic M**. Radical surgical treatment of a large seminal vesicle cyst causing acute urinary retention in a patient with Zinner syndrome: A case report and review of literature. *J Urol Surg.* 2021; 8: 291-293.
5. Cornford P, Smith EJ, MacLennan S... Pan-European National Urological Society IMAGINE Collaborative: **Vukovic M** et al. IMAGINE- impact assessment of guidelines implementation and education: the next frontier for harmonising urological practice across Europe by improving adherence to guidelines. *Eur Urol.* 2021; 79:173-76.
6. **Vukovic M**, Kavaric P, Vukmirovic F, Lekic S. 'Burned-out' primary testicular tumor: Is retroperitoneal lymph node biopsy mandatory prior to initiation of chemotherapy? Report of three cases and a review of th literature. *Andrologia.* 2021; doi:10.1111/and.14283.
7. Kavaric P, Rebronja A, Albijanic M, **Vukovic M**. Surgical technique of uretero-ileal anastomosis in patients with bilateral duplex ureters undergoing radical cystectomy and ileal conduit urinary diversion: Initial experience. *Acta Chir Belg.* 2021; 7:1-6.
8. Djordjevic D, **Vukovic M**. Functional results of Hautmann neobladder with chimney modification and Wallace ureteroileal anastomosis: initial experience with 22 patients. *Int Braz J Urol.* 2020; 47:426-435.
9. Kavaric P, Radovic N, Pratljacic D, Sabovic E, **Vukovic M**. Modified Wallace anastomotic technique reduces ureteroenteric stricture rates after ileal conduit urinary diversion. *Int Braz J Urol.* 2020; 46:446-455.
10. **Vukovic M**, Kavaric P, Magdelinic A, Nikomanis P, Tomovic S, Pelicic D. Perineural Invasion on biopsy specimen as predictor of tumor progression in aging male treated with radical prostatectomy. Could we use it for pre-surgical screening? *Aging Male.* 2019; doi: 10.1080/13685538.2019.1581758.
11. Kavaric P, Magdelinic A, **Vukovic M**. Running suture hemostatic technique versus standard reconstruction of the surgical bed in Zero - Ischemia time mini – flank Open partial nephrectomies. Retrospective, match-paired Case-control study. *Arch Ital Urol Androl.* 2019; doi: 10.481/aiua.2019.2.
12. Fatic N, Kuzmanovic I, Markovic D, Davidovic L, **Vukovic M**, Kostic D. Kidney injury secondary to endovascular treatment of renal artery stenosis. *Aniol Sosud Khir.* 2017; 23:159-163.
13. Pajovic B, Pajovic LJ, **Vukovic M**. Effectiveness of antibiotic treatment in infertile patients with sterile leukocytospermia induced by tobacco use. *Syst Biol Reprod Med.* 2017; doi: 10.1080/19396368.2017.1373158

14. Pajovic B, Dimitrovski A, Fatic N, Malidzan M, **Vukovic M**. Vacuum erection system in the treatment of organic erectile dysfunction and penile vascular differences between patients with DM typ I and DM typ II. *Aging Male* 2017; DOI:10.1080/13685538.2016.1230601.
15. Pajovic B, Radojevic N, Dimitrovski A, **Vukovic M**. Comparison of the efficiency of combined extracorporeal shock-wave therapy and triple therapy versus triple therapy itself Category III B chronic pelvic pain syndrome (CPPS). *Aging Male* 2016; DOI: 10.1080/13685538.2016.1197899.
16. Pajovic B, Dimitrovski A, Radojevic N, Tomovic S, **Vukovic M**. The Therapeutic Potential of Royal Jelly in Benign Prostatic Hyperplasia. Comparison with contemporary literature. *Aging Male* 2016; DOI: 10.3109/13685538.2016.1169400
17. Pajovic B, Radojevic N, Dimitrovski A, **Vukovic M**. A correlation between selenium and carnitine levels with Hypo - osmotic swelling test for sperm membrane in low - grade varicocele patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20: 598-604.
18. B. Pajovic, N. Radojevic, A. Dimitrovski, M. Radovic, R. Rolovic, **M. Vukovic**. Advantages of microsurgical varicocelectomy over conventional techniques. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19:532-538.
19. Pajovic B, Dimitrovski A, Radojevic N, **Vukovic M**. Comparison of Sperm Parameters in Patients with Infertility Induced by Genital Infection versus Varicocele. *Balkan Med J*. 2015; 32:255-259.
20. Pajovic B, Radojevic N, **Vukovic M**, Stjepcevic A. Semen analysis before and after antibiotic treatment of asymptomatic Chlamydia and Ureaplasma related pyospermia. *Andrologia* 2012; 44:18-28.

NASLOV PREDLOŽENE TEME

Na službenom jeziku	Biomarkeri kod karcinoma bešike: Kliničko-patološki i prognostički značaj ekspresije Ki-67
Na engleskom jeziku	Urinary biomarkers in bladder cancer: Clinicopathological and prognostic value of Ki-67 expression

Obrazloženje teme

Karcinom bešike jedan je od najčešće dijagnostifikovanih karcinoma u muškoj populaciji i taj se trend nastavlja kada se u obzir uzmu oba pola. U Europskoj uniji, starosna stopa incidencije je 20 kod muškaraca i 46 godina kod žena (1). Rizik od razvoja karcinoma bešike kod osoba <75 godina je između 2% i 4% za muškarce i 0,5% do 1% za žene.

Obzirom na veliki značaj navedene bolesti u morbiditetu opšte populacije, vrlo je važno unaprijediti dijagnostiku, prognostiku i terapiju karcinoma bešike, pri čemu bi uvođenje urinarnih biomarkera u standardni dijagnostički protokol pacijenata sa verifikovanim karcinomom bešike moglo dovesti do revolucionarnog napretka u tretmanu navedene bolesti. Ki-67 samo je jedan od brojnih biomarkera, čiji prognostički značaj kod karcinoma bešike još uvijek nije jasno

definisan. Naša studija ima za cilj da utvrdi njegov klinički, prediktivni potencijal kod osoba sa dijagnostikovanom karcinomom mokraćne bešike, te da utvrdi postojanje korelacije sa nekim drugim biomarkerima kod pacijenata sa invazivnim karcinomom bešike (IL-1 beta, IL1RA, AKT).

Pregled istraživanja

Uvod: Ki-67 je utvrđeni marker ćelijske proliferacije, a Ki-67 indeks korelira s kliničkim tokom nekoliko vrsta tumora, uključujući karcinom bešike. Međutim, kliničko-patološki i prognostički značaj Ki-67 kod karcinoma bešike ostaje nejasan. Shodno tome, cilj naše studije bio je procijeniti obrasce ekspresije i potencijalnu prognostičku i tumorsko-biološku ulogu Ki-67 kod pacijenata sa ne-mišićno invazivnim karcinomom bešike, a potom se osvrnuti na eventualnu korelaciju ovog biomarkera sa IL-1 β i IL-1RA kod invazivnog karcinoma, na osnovu naših prethodno objavljenih rezultata.

Materijali i metode: Studija bi uključivala dvije nezavisne grupe pacijenata skupine koje bi se sastojale od n=23 i 27 bolesnika (16x muškaraca, medijan dobi 65,5 godina, 23x <T1, <G2 i 20x muškaraca, 69 godine, 27x T1, $\leq$ G2, medijana praćenja 44,5 mjeseci, respektivno) koji su bili podvrgnuti transuretralnoj resekciji tumora (TURB) između 02/96-12/06 i 06/03-12/10. Uzorci tumora i benignog okolnog urotela (n=22) bili bi obrađeni imunohistokemijski i obojeni na Ki-67. Step en ekspresije Ki-67 bi bio izražen kao postotak broja imunološki obojenih jedara u ukupnom broju jedara tumorskih ćelija, bez obzira na intenzitet imunološkog bojenja. Ovo brojanje je sprovedeno u tri nasumično odabrana polja presjeka tkiva, pri uvećanju x400. Rezltat brojanja je bio u rasponu od 0-100%, a njegova granična vrijednost bila je 15%, gdje je „niska imunoreaktivnost“ definisana bojenjem jedra od < 15%, a „visoka“ za bojenje $\geq$ 15%.

Očekivani rezultati: Očekujemo veću ekspresiju Ki-67 kod T1G2 stadijuma bolesti u odnosu na neinvazivne tumore (T2). Osim toga, ispitaćemo korelaciju između stepena ekspresije Ki-67 i progresije u T2 stadijum, kao i korelacije sa karcinom-specifičnim, progresivno-specifičnim i metastatski-specifičnim preživljavanjem pacijenata. Na kraju, osvrnućemo se na korelaciju sa biomarkerima IL-1beta i IL1RA, na osnovu eksterne analize naše prethodne studije.

Cilj i hipoteze

Cilj naše studije je procijena obrasca ekspresije i potencijalna prognostička uloga Ki-67 i ostalih biomarkera kod pacijenata sa karcinomom bešike. Hipoteza 1: ekspresija Ki-67 je veća kod pacijenata sa T1 karcinomom bešike; Hipoteza 2: veća ekspresija Ki-67 korelira sa kraćim vrremenom progresije tumora i metastatski-specifičnim preživljavanjem pacijenata; Hipoteza 3: Ki-67 pokazuje pozitivnu korelaciju sa ekspresijom IL-1beta u eksternoj analizi stduije iz Tübingena.

Materijali, metode i plan istraživanja

Na osnovu institucionalne baze podataka identifikovani su bolesnici podvrgnuti proceduri TURB-a zbog neinvazivnog karcinoma bešike, u periodu od 2010 do 2020 godine, koji su dalje podijeljeni u dvije grupe. Iz uzorka tumorskog tkiva, stvoren je tkivni mikroniz (TMA), temeljen na identifikaciji reprezentativnih dijelova tumora i normalnog tkiva u bojenju hematoxilinom i eozinom. Nadalje, odgovarajući histopatološki benigni uzorci tkiva urotela iz okolnih područja obrađeni su na TMA i IHC obojeni na Ki-67. Prvu skupinu

činilo je 23 pacijenta, dok je u drugoj grupi bilo 27 ispitanika. Gradus i stadijum tumora procijenili su najmanje dva patologa s iskustvom u urogenitalnoj patologiji, na osnovu WHO 2016 TNM klasifikacijskom sustavu. Kliničko-patološke karakteristike upisane su u registar bolesnika..

TMA i imunohistokemijsko (IHC) bojenje

Da bi se dobile reprezentativna jedra za konstrukciju TMA, koristićemo paralelne sekcije obojene hematoksilinom i eozinom za identifikaciju reprezentativne pozicije jedra unutar uzoraka. IHC bojenje je sprovedeno prema protokolu proizvođača antitijela. Uzorci će biti inkubirani preko noći na 4 °C s ljudskim imunoglobulinima u razrjeđenjima 1:10 i 1:300, u razrjeđivaču pravih antitijela (DAKO, Glostrup, Danska). Nakon tri koraka ispiranja u Tris-puferiranoj fiziološkoj otopini, dodaćemo sekundarno Biozol HRP polimerno anti-kozje antitijelo (DAKO, Glostrup, Danska) sa 40 min inkubacije na sobnoj temperaturi. Nakon još tri koraka ispiranja, vizuelizacija će biti sprovedena sa Dako Liquid DAB-Substrat Chromogen System K3467 (DAKO, Glostrup, Danska) i kontrastnim bojenjem s hematoksilinom, kako je naveo proizvođač. Integrirana su dva ili više jedara svakog uzorka tumora i odgovarajućeg normalnog tkiva bešike. Odgovarajući histopatološki benigni uzorci tkiva dobijeni su iz parafinskih blokova bez tumora.

Imunohistokemijski protokol

Ki-67 skor izražen je kao procenat broja imunološki obojenih jedara među ukupnim brojem jedara tumorskih ćelija, bez obzira na intenzitet imunološkog bojenja. Ovo brojanje je izvedeno u tri nasumično odabrana polja presjeka tkiva karcinoma, pri povećanju x400. Ki-67 rezultat bio je u rasponu od 0-100%, a njegova granična vrijednost bila je 15%, gdje je „niska imunoreaktivnost“ definisana bojenjem jedra od < 15%, a „visoka“ za bojenje ≥ 15%. TMA je sproveden od strane dva nezavisna ispitivača, a divergentni rezultati su ponovno ocijenjeni. Mikroskopska analiza je izvedena na x100 i x400 povećanja.

Očekivani naučni doprinos

Uvođenje novih biomarkera u dijagnostici i prognostici invazivnih i neinvazivnih karcinoma mokraćne bešike.

Spisak objavljenih radova kandidata

Naveden u popisu radova

Popis literature

1. Wang JZ, Zhu W, Han J, Yang X, Zhou R, Lu HC, Yu H, Yuan WB, Li PC, Tao J, Lu Q, Wei JF, Yang H. The role of the HIF-1 α /ALYREF/PKM2 axis in glycolysis and tumorigenesis of bladder cancer. Cancer Commun (Lond). 2021; 41:560-575.
2. Huang W, Li Y, Zhang C, Zha H, Zhou X, Fu B, Guo J, Wang G. IGF2BP3 facilitates cell proliferation and tumorigenesis via modulation of JAK/STAT signalling pathway in human bladder cancer. J Cell Mol Med. 2020; 24:13949-13960.
3. Massari F, Ciccarese C, Santoni M, Iacovelli R, Mazzucchelli R, Piva F, Scarpelli M, Berardi R, Tortora G, Lopez-Beltran A, Cheng L, Montironi R. Metabolic phenotype of bladder cancer. Cancer Treat Rev. 2016; 45:46-57.

4. Rausch S, Hennenlotter J, Teepe K, Kuehs U, Aufderklamm S, Bier S, Mischinger J, Gakis G, Stenzl A, Schwentner C, Todenhöfer T. Muscle-invasive bladder cancer is characterized by overexpression of thymidine kinase 1. *Urol Oncol.* 2015; 33:426.e21-9.
5. Xia H, Green DR, Zou W. Autophagy in tumour immunity and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2021; 21:281-297.
6. Deretic V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism. *Immunity.* 2021. 9; 54:437-453.
7. Vetterlein MW, Roschinski J, Gild P, Marks P, Soave A, Doh O, Isbarn H, Höppner W, Wagner W, Shariat SF, Brausi M, Büscheck F, Sauter G, Fisch M, Rink M. Impact of the Ki-67 labeling index and p53 expression status on disease-free survival in pT1 urothelial carcinoma of the bladder. *Transl Androl Urol.* 2017; 6:1018-1026.
8. Tian Y, Ma Z, Chen Z, Li M, Wu Z, Hong M. Clinicopathological and prognostic value of Ki-67 expression in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016; 11:e0158891.
9. Liu C, Xu P, Chen D, Fan X, Xu Y, Li M, Yang X, Wang C. Roles of autophagy-related genes Beclin-1 and LC3 in the development and progression of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Biomed Rep.* 2013; 1:855-860.
10. Liu GH, Zhong Q, Ye YL, Wang HB, Hu LJ, Qin ZK, Zeng MS, Zeng BH. Expression of beclin 1 in bladder cancer and its clinical significance. *Int J Biol Markers.* 2013; 28:56-62.
11. Hyera Kim, Su Jin Lee, In Kyoung Lee, Suejean C Min, Hyun Hwan Sung, Byong Chang Jeong, Jeeyun Lee, Se Hoon Park. Synergistic Effects of Combination Therapy with AKT and mTOR Inhibitors on Bladder Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2020; 21:2825.
12. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008; 454:436-44.
13. Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett.* 2010; 584:1427-35.
14. Matsumoto H, Munemori M, Shimizu K, Fujii N, Kobayashi K, Inoue R, Yamamoto Y, Nagao K, Matsuyama H. Risk stratification using Bmi-1 and Snail expression is a useful prognostic tool for patients with upper tract urothelial carcinoma. *Int J Urol.* 2016; 23:1030-1037.
15. Wang F, et al. IL-1 β receptor antagonist (IL-1Ra) combined with autophagy inducer (TAT-Beclin1) is an effective alternative for attenuating extracellular matrix degradation in rat and human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2019. PMID: 3129198
16. de Luca A, Smeekens SP, Casagrande A, Iannitti R, Conway KL, Gresnigt MS, et al. IL-1 receptor blockade restores autophagy and reduces inflammation in chronic granulomatous disease in mice and in humans. *Proc Natl Acad Sci.* 2014; 111:3526–3531.
17. Crişan TO, et al. Inflammasome-independent modulation of cytokine response by autophagy in human cells. *PLoS ONE.* 2011; 6:e18666.
18. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol.* 2016; 70:106-119.
19. Chen Y, Yang Z, Deng B, Wu D, Quan Y, Min Z. Interleukin 1 β /1RA axis in colorectal cancer regulates tumor invasion, proliferation and apoptosis via autophagy. *Oncol Rep.* 2020; 43:908-918.

20. John A, Günes C, Bolenz C, Vidal-Y-Sy S, Bauer AT, Schneider SW, Gorzelanny C. Bladder cancer-deriv interleukin-1 converts the vascular endothelium into a pro-inflammatory and pro-coagulatory surface. BM Cancer. 2020; 20:1178.

SAGLASNOST PREDLOŽENOG/IH MENTORA I DOKTORANDA SA PRIJAVOM

Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje.

Prvi mentor Miodrag Aćimović

Drugi mentor (Ime i prezime)

(Potpis)

Doktorand Marko Vuković

IZJAVA

Odgovorno izjavljujem da doktorsku disertaciju sa istom temom nisam prijavio/la ni na jednom drugom fakultetu.

U Podgorici,
07.06.2023

Ime i prezime doktoran

Marko Vukovic