

OCJENA PRIJAVE DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Dr.med spec. Vuković Marko
Fakultet	Medicinski fakultet Podgorica
Studijski program	Medicina
Broj indeksa	10/12
Podaci o magistarskom radu	
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	Biomarkeri kod karcinoma bešike: Kliničko-patološki i prognostički značaj ekspresije Ki-67, p53 i CD-31
Na engleskom jeziku	Urinary biomarkers in bladder cancer: Clinicopathological and prognostic value of Ki-67, p53 and CD-31 expression
Datum prihvatanja teme i kandidata na sjednici Vijeća organizacione jedinice	17.11.2023
Naučna oblast doktorske disertacije	Medicina/Urologija
Za navedenu oblast matični su sljedeći fakulteti	
Na Univerzitetu Crne Gore -Medicinski fakultet -Studijski program Medicina	
A. IZVJEŠTAJ SA JAVNE ODBRANE POLAZNIH ISTRAŽIVANJA DOKTORSKE DISERTACIJE	
Javna odbrana polaznih istraživanja i izalaganje istraživačkog programa (ciljevi i očekivani rezultati) doktorske disertacije kandidata dr med. Marka Vukovića, pod nazivom „Biomarkeri kod karcinoma bešike: Kliničko-patološki i prognostički značaj ekspresije Ki-67, p53 i CD-31“ održana je 17.11.2023g. u 11 h u Sali za sastanke na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore, i to pred komisijom u sastavu : 1. Prof. dr Filip Vukmirović, redovni profesor na Medicinskom fakultetu UCG u Podgorici, predsjednik komisije; 2. Prof. dr Miodrag Aćimović, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu ; Srbija; član komisije; Mentor; 3. Prof. dr Vladimir Todorović , redovni profesor na Medicinskom fakultetu UCG u Podgorici; član komisije; U uvodnom dijelu dvadesetminutnog izlaganja , kandidat je obrazložio temu rada, dao pregled dosadašnjih istraživanja u oblasti, predstavio metodologiju rada, pojasnio ciljeve i hipoteze istraživanja i izložio očekivane rezultate. Nakon izlaganja kandidata, članovi komisije su otvorili diskusiju, postavili pitanja na koja je kandidat uspješno odgovorio. Članovi komisije su dali komentare i sugestije na prijavljenu temu i to: 1. Potrebno je dopuniti istraživanje dodatnim biomarkerima, uključujući i markere	

angiogeneze (CD-31);

2. Potrebno je izmijeniti naslov teme, u skladu sa ispitivanim biomarkerima (Ki-67, p53 i CD-31);

3. Potrebno je dopuniti metodologiju gdje bi se povećao uzorak ispitanika na kom će se obaviti istraživanje, u cilju dobijanja vjerodostojnih rezultata istraživanja.

Kandidat je prihvatio navedene sugestije i iste ugradio u novu prijavu teme doktorske disertacije.

Komisija je jednoglasno donijela odluku da je kandidat dr Marko Vuković uspješno odbranio polazna istraživanja i istraživački program doktorskih studija.

Javna odbrana je završena u 12h.

B. OCJENA PRIJAVE TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

B1. 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. 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 i p53 su samo neki od brojnih biomarkera, čiji je prognostički značaj kod karcinoma bešike već prepoznat. Međutim, uloga markera angiogeneze je još uvijek kontroverzna i rezultati dosadašnjih studija su kontroverzni. Naša studija ima za cilj da utvrdi klinički i prediktivni potencijal markera Ki-67, p53, kao i markera angiogeneze CD-31 kod osoba sa dijagnostikovanim ne-mišično invazivnim karcinomom mokraćne bešike (NMIBC), te da utvrdi postojanje korelacije ekspresije navedenih markera sa recidivom i progresijom bolesti.

B2. Cilj i hipoteze

Cilj naše studije je procijena obrasca ekspresije i potencijalna prognostička uloga KI-67, p53 i CD-31 kod pacijenata sa NMIBC.

Hipoteza 1: Imunohistohemijska ekspresija markera angiogeneze (CD-31) korelira sa ekspresijom Ki-67 i p53 u uzorku tkiva nakon transuretralne resekcije kod pacijenata sa NMIBC;

Hipoteza 2: CD-31 je nezavisni biomarker predikcije recidiva i progresije bolesti;

Hipoteza 3: prediktivna vrijednost CD-31 izraženija u kombinaciji sa hiperekspresijom Ki-67 i p53..

B3. Metode i plan istraživanja

Na osnovu institucionalne baze podataka identifikovani su bolesnici podvrgnuti proceduri TURB-a kod NMIBC, u periodu od 2016 do 2020 godine, koji su dalje podijeljeni u dvije grupe. Iz uzorka tumorskog tkiva, stvoren je tkivni mikrouzorak (TMA), koji se bazira na identifikaciji reprezentativnih dijelova

tumora i normalnog tkiva u bojenju hematoksilinom i eozinom. Nadalje, odgovarajući histopatološki benigni uzorci tkiva urotela iz okolnih područja obrađeni su na TMA i IHC i bojani na Ki-67, p53 i CD-31. U okviru prve grupe ispitanika, biće formirana podgrupa sa T1G3 tumorima, dok će u drugoj grupi biti izdvojena podgrupa sa TaG1 tumorima, na osnovu čega ćemo uporediti stepen ekspresije navedenih biomarkera kod dvije krajnosti iste bolesti – one koja je bliska mišićno –invazivnim tumorima (T1G3) i druge koja je izrazito niskog malignog potencijala (TaG1). Gradus i stadijum tumora procjenjuju najmanje dva patologa sa višegodišnjim 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 dobila 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 sa ljudskim imunoglobulinima u razrjeđenjima 1:10 i 1:300, u razrjeđivaču pravih antitijela (DAKO, Glostrup, Danska). Nakon tri koraka ispiranja u Tris-puferskom fiziološkom rastvoru, dodaćemo sekundarno Biozol HRP polimersko anti-kozje antitijelo (DAKO, Glostrup, Danska) tokom 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. Odgovarajući histopatološki benigni uzorci tkiva biće uzeti 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 je u rasponu od 0-100%, a njegova granična vrijednost je 15%, gdje je „niska imunoreaktivnost“ definisana bojenjem jedra od < 15%, a „visoka“ za bojenje ≥ 15%. Za p53, abnormalna ekspresija znači prisustvo ili 0% ili > 50% obojenih tumorskih jedara, dok evaluacija CD-31 uključuje i analizu denziteta mikrovaskulature (MVC) i mikrovaskulturne površine (VSA), u pojedinim zonama sa najintenzivnijim bojenjem na mikroskopskom preparatu. TMA biće sproveden od strane dva nezavisna ispitivača, a divergentni rezultati ponovno ocijenjeni. Mikroskopska analiza biće sprovedena na uvećanju x100 i x400.

B4. Naučni doprinos

Uvođenje novih biomarkera u dijagnostici i prognostici invazivnih i neinvazivnih karcinoma mokraćne bešike, kao i procjena potencijalnih 'target' biomarkera za ciljanu terapiju karcinoma mokraćne bešike, naročito formi refraktarnih na terapiju.



Predloženo istraživanje biće sprovedeno u Kliničkom centru Crne Gore, kao i na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore i finansijski je u potpunosti izvodljivo.

Nakon uvida u priloženu dokumentaciju, novu podnesenu prijavu teme doktorske disertacije javnog izlaganja kandidata i nakon diskusije, Komisija je dala pozitivnu ocjenu podobnosti doktorske teme i kandidata.

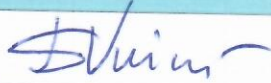
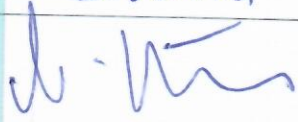
Prijedlog izmjene naslova

Prijedlog promjene mentora i/ili imenovanje drugog mentora

Planirana odbrana doktorske disertacije

Izdvojeno mišljenje

Ime i prezime

Napomena		
Nije bilo dodatnih napomena.		
ZAKLJUČAK		
Predložena tema po svom sadržaju odgovara nivou doktorskih studija.	DA	NE
Tema je originalan naučno-istraživački rad koji odgovara međunarodnim kriterijumima kvaliteta disertacije.	DA	NE
Kandidat može na osnovu sopstvenog akademskog kvaliteta i stečenog znanja da uz adekvatno mentorsko vođenje realizuje postavljeni cilj i dokaže hipoteze.	DA	NE
Komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata		
Prof. dr Filip Vukmirović, redovni profesor na Medicinskom fakultetu UCG u Podgorici; predsjednik komisije		
Prof. dr Miodrag Aćimović, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu ; Srbija; član komisije; Mentor;		
Prof. dr Vladimir Tododrović, redovni profesor na Medicinskom fakultetu UCG u Podgorici ; Crna Gora; član komisije; Komentor		
DEKAN Prof. dr Miodrag Radunović MP _____		

PRILOG

PITANJA KOMISIJE ZA OCJENU PRIJAVE DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA	
(Titula, ime i prezime člana komisije) Prof. Dr. Miroslav Acimović	1. Da li su studijom obuhvaćeni i pacijenti čiji patohistološki nalaz pokazuje prisustvo vaskularne histologije, a ne samo metastatski karcinom?
(Titula, ime i prezime člana komisije) Prof. Dr. Vladimir Toporović	1. Kakvi je planirani period praćenja pacijenata ('Follow-up period')?
(Titula, ime i prezime člana komisije) Prof. Dr. Filip Vukmićević	1. Kako bi se očekivali rezultati studije mogli primijeniti u svakodnevnoj praksi?
(Titula, ime i prezime člana komisije)	
(Titula, ime i prezime člana komisije)	
PITANJA PUBLIKE DATA U PISANOJ FORMI	
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
ZNAČAJNI KOMENTARI	



UNIVERZITET CRNE GORE MEDICINSKI FAKULTET			
Primljen	24.11.2023		
Org. jed.	med	Prilog	Vrednost
1677/6-3			

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 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. <i>Acta Chir Belg.</i> 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 the 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 varicocelelectomy 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, p53 i CD-31
Na engleskom jeziku	Urinary biomarkers in bladder cancer: Clinicopathological and prognostic value of Ki-67, p53 and CD-31 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 Evropskoj uniji, starosna stopa incidencije je 20 kod muškaraca i 46 godina kod žena. 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 i p53 su samo neki od brojnih biomarkera, čiji je prognostički značaj kod karcinoma bešike već prepoznat. Međutim, uloga markera angiogeneze je još uvijek kontroverzna, kao i rezultati dosadašnjih studija. Naša studija ima za cilj da utvrdi klinički i prediktivni potencijal markera Ki-67, p53, kao i markera angiogeneze CD-31 kod osoba sa dijagnostikovanim ne-mišićno invazivnim karcinomom mokraćne bešike (NMIBC), te da utvrdi korelaciju ekspresije navedenih markera sa recidivom i progresijom bolesti.

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. p53 je biomarker povezan sa lošijom prognozom invazivnih karcinoma bešike, te rezistencijom na neoadjuvantnu hemioterapiju i ranom progresijom bolesti. CD-31 je marker angiogeneze koji bi mogao korelirati sa pozitivnim ishodom liječenja bolesti. Shodno tome, cilj naše studije bio je procijeniti obrasce ekspresije i potencijalnu prognostičku i tumorsko-biološku ulogu KI-67, p53 i CD-31 kod pacijenata sa NMIBC, a potom se osvrnuti na korelaciju ovih biomarkera sa evolucijom bolesti – incidencom rekurencije i progresije bolesti (rekurentno-specifičnim i progresivno-specifičnim preživljavanjem pacijenata - RFS i PFS).

Materijali i metode: Studija bi uključivala dvije nezavisne grupe pacijenata koje bi se sastojale od N1=90 i N2=85 bolesnika, koji bi bili podvrgnuti transuretralnoj resekciji tumora (TURB) između 2016 i 2023 godine. U prvoj grupi bi bili pacijenti sa tumorima gradusa $\geq G2$, dok bi druga grupa uključivala G1 tumore, bez obzira na stadijum tumora (T_a ili T_a). Uzorci tkiva tumora i benignog okolnog urotela (n=40) bili bi obrađeni imunohistokemijski i obojeni na Ki-67, p53 i CD-31. Step ekspresije Ki-67 i p53 bio bi izražen kao postotak broja imunološki obojenih jedara u ukupnom broju jedara tumorskih ćelija, bez obzira na intenzitet imunološkog bojenja. Ovo brojanje se sprovodi u tri nasumično odabrana polja presjeka tkiva, pri uvećanju x400. Rezultat brojanja je u rasponu od 0-100%, a njegova granična vrijednost 15%, gdje je „niska imunoreaktivnost“ definisana bojenjem jedra od $< 15\%$, a „visoka“ za bojenje $\geq 15\%$. Za p53, abnormalna ekspresija znači prisustvo ili 0% ili $> 50\%$ obojenih tumorskih jedara, dok evaluacija CD-31 uključuje i analizu denziteta mikrovaskulature (MVC) i mikrovaskulturne površine (VSA), u pojedinim zonama sa najintenzivnijim bojenjem na mikroskopskom preparatu.

Očekivani rezultati: Očekujemo veću ekspresiju Ki-67 i p53 kod G2 i G3 stadijuma bolesti, u odnosu na tumore niskog gradusa (G1). Osim toga, očekujemo da ekspresija CD-31 korelira sa ekspresijom ostalih markera i da ima klinički prediktivni značaj (RFS i PFS).

Cilj i hipoteze

Cilj naše studije je procijenjena obrasca ekspresije i potencijalna prognostička uloga KI-67, p53 i CD-31 kod pacijenata sa NMIBC. Hipoteza 1: Imunohistohemijska ekspresija markera angiogeneze (CD-31) korelira sa ekspresijom Ki-67 i p53 u uzorku tkiva nakon transuretralne resekcije kod pacijenata sa NMIBC; Hipoteza 2: CD-31 je nezavisni biomarker predikcije recidiva i progresije bolesti; Hipoteza 3: prediktivna vrijednost CD-31 izraženija u kombinaciji sa hiperekspresijom Ki-67 i p53.

Materijali, metode i plan istraživanja

Na osnovu institucionalne baze podataka identifikovani su bolesnici podvrgnuti proceduri TURB-a kod NMIBC, u periodu od 2016 do 2020 godine, koji su dalje podijeljeni u dvije grupe. Iz uzorka tumorskog tkiva, stvoren je tkivni mikrouzorak (TMA), koji se bazira na identifikaciji reprezentativnih dijelova tumora i normalnog tkiva u bojenju hematoksilinom i eozinom. Nadalje, odgovarajući histopatološki benigni uzorci tkiva urotela iz okolnih područja obrađeni su na TMA i IHC i bojeni na Ki-67, p53 i CD-31. U okviru prve grupe ispitanika, biće formirana podgrupa sa T1G3 tumorima, dok će u drugoj grupi biti izdvojena podgrupa sa TaG1 tumorima, na osnovu čega ćemo uporediti stepen ekspresije navedenih biomarkera kod dvije krajnosti iste bolesti – one koja je bliska mišićno –invazivnim tumorima (T1G3) i druge koja je izrazito niskog malignog potencijala (TaG1). Gradus i stadijum tumora procjenjuju najmanje dva patologa sa višegodišnjim 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 dobila 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-puferskom fiziološkom rastvoru, dodaćemo sekundarno Biozol HRP polimerno anti-kozje antitijelo (DAKO, Glostrup, Danska) tokom 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. Odgovarajući histopatološki benigni uzorci tkiva biće uzeti 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 je u rasponu od 0-100%, a njegova granična vrijednost je 15%, gdje je „niska imunoreaktivnost“ definisana bojenjem jedra od < 15%, a „visoka“ za bojenje ≥ 15%. Za p53, abnormalna ekspresija znači prisustvo ili 0% ili > 50% obojenih tumorskih jedara, dok evaluacija CD-31 uključuje i analizu denziteta mikrovaskulature (MVC) i mikrovaskulturne površine (VSA), u pojedinim zonama sa najintenzivnijim bojenjem na mikroskopskom preparatu. TMA biće sproveden od strane dva nezavisna ispitivača, a divergentni rezultati ponovno ocijenjeni. Mikroskopska analiza biće sprovedena na uvećanju x100 i x400.

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-derived interleukin-1 converts the vascular endothelium into a pro-inflammatory and pro-coagulatory surface. BMC Cancer. 2020; 20:1178.
21. Bertz S, Abeé C, Schwarz-Furlan S, Alfer J, Hofstädter F, Stoehr R, Hartmann A, Gaumann AK. Increased angiogenesis and FGFR protein expression indicate a favourable prognosis in bladder cancer. Virchows Arch. 2014;465:687-95.

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,

Ime i prezime doktoranda

Marko Vuković