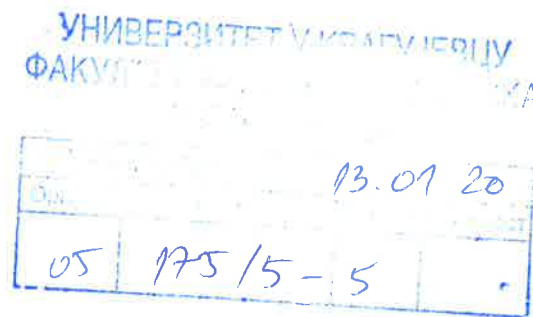


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-910/33 од 13.11.2019. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Бранка Андрића** под називом:

„Улога експресије **СОРВ2** и процеса апоптозе у настанак карцинома  
ендометријума“

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је комисија у саставу:

1. **Проф. др Александар Живановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, председник;
2. **Др Данијела Цветковић**, научни сарадник, Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу, научна област *Биологија*, члан;
3. **Проф. др Ана Митровић Јовановић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

Кандидат **Бранко Андрић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

## 2.1. Кратка биографија кандидата

Бранко Андрић, рођен 1983. године у Новом Пазару, живи у Рашкој. Основну и средњу школу (Гимназија, природно-математички смер) завршио у Рашкој као носилац Вукове дипломе. Уписао Медицински факултет Универзитета у Београду школске 2002/2003 године и завршио 2009. године са просечном оценом 8,17. У току факултета 2006. године завршио курс из Прве помоћи. По завршетку факултета одрадио приправнички стаж и положио државни испит у марту 2010. године. Одслужио војни рок 2010/2011 године у Школи резервних официра Војске Србије, Санитетска служба. Волонтирао у периоду од 6 месеци на одељењу Хирургије у Општој болници „Нови Пазар“ током 2010. године. Уписао докторске студије на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу, смер Хумана репродукција и развој школске 2010/2011 године. Од 2012. године запослен у Дому здравља „Рашка“; радио у Служби за здравствену заштиту одраслих и амбуланти Хитне помоћи. Уписао специјализацију из Гинекологије и акушерства 2016. године на Медицинском факултету у Београду.

## 2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

**Наслов:** “Улога експресије *СОРВ2* и процеса апоптозе у настанку карцинома ендометријума “

**Предмет:** Испитивање значаја експресије гена за *СОРВ2* као и улоге апоптозе на настанак карцинома ендометријума.

### **Хипотезе:**

1. Постојање повећане експресије гена за *СОРВ2* у ћелијама ендометријалног ткива значајан је фактор који доводи до настанка карцинома ендометријума.

2. Повећана експресија протеина *bcl-2* удружена са повећаном експресијом *СОРВ2* повећава ризик за настанак карцинома ендометријума.

3. Предвидети вредност повећане експресије гена за *СОРВ2* у ћелијама ендометријалног ткива која доводи до настанка карцинома ендометријума.

### 2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Бранко Андрић, је објавио 1 рад у целини у часопису категорије M51, у коме је први аутор, чиме је стекао услов за пријаву теме докторске дисертације:

**Branko Andrić, Petar Arsenijević, Nikola Jović, Neda Arsenijević, Zoran Protrka** Juvenile type granulosa cell tumor *Journal of Clinical and Experimental research*, 2018, 19 (4), 389-392.

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Карцином ендометријума представља најчешћи карцином женских полних органа. Инциденца карцинома ендометријума је у порасту, како због продуженог људског века тако и због повећане изложености факторима ризика (гојазност, рана менарха, нулипаритет, касна менопауза). У Србији, у 2018-ој години, број жена оболелих од карцинома ендометријума је био 19.2 на 100000 жена. Не постоји ни један ефикасан *skrining* тест за рано откривање карцинома ендометријума. Крварење из ендометријума представља први и рани симптом болести који води непосредном постављању дијагнозе. Због тога се препоручује да се код сваког постменопаузалног крварења као и рецидивирајућих менометрорагија у перименопаузи искључи карцином ендометријума.

Основна подела карцинома ендометријума је на две групе :

I група: условљен је хроничном естрогеном стимулацијом и настаје обично на терену хиперплазије ендометријума, добро диферентован. По хистолошким карактеристикама дели се на: ендометриоидни аденокарцином (најчешћи тип, јавља се у преко 75% случајева), муцинозни аденокарцином, мешовити аденокарцином, планоцелуларни карцином, транзициоцелуларни карцином, ситноћелијски карцином, недиферентовани карцином.

II група: естроген независни, ређи тип од кога обољевају жене старије животне доби, слабо диферентован и има лошију прогнозу. Хистолошки се дели на: серозни аденокарцином и светлоћелијски аденокарцином-*clear cell*.

Малигна трансформација ћелије, потом и ткива увек је узрокована генетским променама које нарушавају раст и програмирану ћелијску смрт. Генске мутације могу послужити као

окидач за активацију протоонкогена који стимулишу пролиферацију ћелија и/или инхибирају тумор супресорне гене, доводећи до оштећења ћелије и заустављања програмиране ћелијске смрти - апоптозе. Инхибиција апоптозе удружена са поремећајем репарационих ДНК механизма доводи до убрзаног нагомилавања генетских грешака, поремећаја у транскрипцији и последичног развоја малигнитета.

Апоптоза је активан процес генетски регулисаног ћелијског самоуништења и представља програмирану ћелијску смрт која се нормално виђа у физиолошким процесима у организму (ембриогенези, диференцијацији ћелија). Протеини фамилије bcl-2 кључни су интрацелуларни регулатори процеса апоптозе у којој учествују као њени инхибитори. Пређашња истраживања су показала да је процес апоптозе, поред протеинима фамилије bcl-2, регулисан бројним интрацелуларним модулаторима. Протеини комплекса COPB2 (Coatamer protein complex subunit  $\beta 2$ ) чине главну од 7 субјединица COP1 комплекса (Coatamer protein complex I). Протеински комплекс COP1 учествује у транспорту протеина између ендоплазматског ретикулума и Голџијевог апарата формирањем транспортних везикула. Смањена активност COPB2 у ћелијама доводи до заустављања ћелијског циклуса у G0/G1 или S фази ћелијске деобе и смањује ћелијски раст и пролиферацију.

## **2.5. Значај и циљ истраживања**

Циљ ове студије је да се анализира поремећај регулације апоптозе преко протеина bcl-2, експресија гена за COPB2, као и да се утврди њихова повезаност са карциномом ендометријума.

Очекујемо да постојање поремећаја регулације апоптозе и повећане експресије гена за COPB2 значајно повећава вероватноћу појаве карцинома ендометријума. Резултати који би се добили из овог истраживања били би употребљени у научне сврхе, са надом да ће касније наћи начин примене и у клиничкој пракси.

## **2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима**

Истраживања која су потврдила важност улоге повећане експресије гена за COPB2 у настанку карцинома рађена су испитивањем различитих органа: карцинома колоне,

карцинома плућа, карцинома простате, холангиоцелуларног карцинома као и карцинома желуца. Након што су исти резултати потврђени и код карцинома дојке, отворило се питање да ли овај интрацелуларни транспортни механизам има значаја и у настанку карцинома ендометријума као естроген зависног ткива.

## **2.7. Методе истраживања**

### **2.7.1. Врста студије**

Проспективна контролисана клинички експериментална студија.

### **2.7.2. Популација која се истражује**

У студију ће бити укључене пацијенткиње које своје лечење спроводе на Гинеколошко - акушерској Клиници КЦ „Крагујевац“ и које испуњавају укључујуће критеријуме и немају искључујуће критеријуме. Истраживачи ће се у потпуности придржавати принципа добре клиничке праксе током истраживања које је одобрио надлежни Етички комитет.

### **2.7.3. Узорковање**

Истраживање ће бити спроведено на две групе пацијенткиња. Експерименталну групу ће чинити 40 пацијенткиња код којих је претходно потврђен карцином ендометријума експлоративном киретажом. Контролну групу би чиниле пацијенткиње код којих би се након експлоративне киретаже хистопатолошки искључиле премалигне и малигне промене ендометријума.

Укључујући критеријуми за учествовање у студији су:

1. Потписан добровљни пристанак за учествовање у студији.
2. Дијагностикован карцином ендометријума хистопатолошком анализом након експлоративне киретаже код пацијенткиња у експерименталној групи. Ендометријално ткиво би се узимало након оперативне процедуре (хистеректомија са или без аднексектомије и лимфаденектомије) .

3. Све пацијенткиње код којих би била урађена експлоративна киретажа, а којима би се патохистолошком анализом искључило постојање карцинома ендометријума или атипична хиперплазија улазиле би у контролну групу уколико немају искључујуће критеријуме.

Искључујући критеријуми:

1. Пацијенткиње које у тренутку узимања материјала за испитивање имају још једну или више дијагностикованих малигну болести, а чије лечење још увек није завршено.
2. Пацијенткиње које користе хормонска контрацептивна средства.
3. Пацијенткиње код којих је крварење последица коагулопатије или употребе антикоагулантних средстава (нискомолекуларни хепарини).
4. Пацијенткиње код којих је крварење условљено трудноћом.

Пацијенткиње које се лече од психијатријских болести и које нису у могућности да дају валидну сагласност.

#### ***Протокол истраживања :***

Истраживање ће бити спроведено на две групе пацијенткиња. Експерименталну групу ће чинити 40 пацијенткиња код којих је претходно потврђен карцином ендометријума експлоративном киретажом. Након завршеног оперативног лечења пацијенткињама би се узимао узорак малигно измењеног ткива и похрањивао у течни азот. Код пацијенткиња које би ушле у експерименталну групу не би смо узимали у обзир дубину инвазије карцинома, као ни постојање метастатских промена. Контролну групу би чиниле пацијенткиње код којих би се након експлоративне киретаже хистопатолошки искључиле премалигне и малигне промене ендометријума. Узорци који би се узимали за контролну групу чували би се до пристизања хистопатолошких резултата, а за анализу би се користили само они који испуњавају укључујуће критеријуме. Генетска обрада материјала била би спроведена на Институту за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу. По одмрзавању из ткива би се методом реверзне транскрипције квантитативног PCR-а (reverse transcription-quantitative PCR / RT-qPCR) оређивала експресија гена за СОРВ2 и протеин bcl-2 у ћелијама ендометријалног ткива.

Изолација РНК (рибонуклеинске киселине) из ткива и ћелија:

Из узорака (ендометријално ткиво) изоловаће се рибонуклеинска киселина по принципу за изолацију РНК који се заснива на фенол/хлороформ реакцији коју су први описали Chomczynski и Sacchi (1987). Користили би смо TRIzol реагенс по упутствима произвођача. Концентрацију сваког узорка би смо измерили на биофотометру (*Eppendorf BioPhotometer Plus*). Однос апсорбанци 260 и 280 nm који је између 1.8-2.0 представљао би показатељ чисте РНК без присуства других компоненти. РНК узорци били би чувани на -80 °C до започињања анализа.

Реверзна транскрипција (RT-PCR):

Једноланчана РНК се преписује у комплементарну ДНК (енгл. *Complementar DNA* - cDNA) по принципу комплементарности помоћу ензима реверзне транскриптазе (енгл. *Reverse Transcriptase*, RT). Користили би смо неки од комерцијално доступних китова (нпр: *Qiagen Seniscript RT Mix*) и изоловану РНК, одговарајуће концентрације. Апарат *MultiGene OptiMax Thermal* (*Labnet International Inc. North America*) програмирали би у складу са упутствима произвођача. Добијени узорци комплементарне ДНК до започинњања анализа би се чували на -80 °C.

Квантитативна ланчана реакција полимеразе (qRT-PCR):

За анализу генске експресије користили би комплементарну ДНК као полазни молекул. На тржишту постоје комерцијално доступни китови (нпр: *Master mix (Universal Kapa Sybr fast qPCR Master Mix 2x)*), који у себи садржи све потребне компоненте за реакцију, изузев пара прајмера, узорка комплементарне ДНК и боје (*Rox Low*) које се додају одвојено. По упутству произвођача направили би реакциону смешу која би садржала све компоненте потребне за qPCR, осим комплементарне ДНК. Реакциона смеша била би прављена за сваки ген појединачно.

Прајмери за гене *β-actin*, *COPB2*, *Bcl-2*:

| Прајмер        | Секвенца прајмера ( <i>Forward</i> ) | Секвенца прајмера ( <i>Reverse</i> )  |
|----------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>β-actin</i> | 5'-AAGCAGGAGTATGACGAGTCCG-3'         | 5'-GCCTTCATACATCTCAAGITGG-3'          |
| <i>COPB2</i>   | 5'-CTTCCTGTTTCGAGCTGCAAAG-3'         | 5'-CACTCTAATCTGCATGTCATCC-3'          |
| <i>Bcl-2</i>   | 5' ATC GCC CTG TGG ATG ACT GAG 3'    | 5' CAG CCA GGA GAA ATC AAA CAG AGG 3' |

PCR плоче са комплементарном ДНК и реакционом смешом стављале би се у апарат *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems*. У складу са упутствима произвођача активирао би се програм. Након завршеног процеса, добијени резултати били би анализирани софтвером *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR*. Релативна квантификација експресије испитиваних гена добила би се у односу на експресију  $\beta$ -actin-a („housekeeping gene“) у истом узорку као контрола.

За израчунавање релативне генске експресије користиће се следећа формула:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \Delta C_{T1} - \Delta C_{T2}$$

$\Delta C_{T1}$  = разлика  $C_T$  вредности испитиваног гена и  $C_T$  вредности  $\beta$ -actin-a у експерименталној групи.

$\Delta C_{T2}$  = разлика  $C_T$  вредности испитиваног гена и  $C_T$  вредности  $\beta$ -actin-a у контролној групи.

#### 2.7.4. Варијабле

**Независне варијабле:** експресија гена за COPB2, експресија гена за протеин bcl-2.

**Зависна варијабла:** карцином ендометријума.

**Збуњујуће варијабле:** године старости, индекс телесне масе - BMI /Body Mass Index/ (<29,9/>30), конзумирање дувана (да/не), број трудноћа, број порођаја, број побачаја, примена контрацептивних средстава (да/не), позитивна породична анамнеза (да/не) и пацијенткиње лечене од карцинома дојке (да/не).

#### 2.7.5. Снага студије и величина узорка

За одређивање величине узорка користи се софтвер G\*Power 3.0.10.

Главни циљ ове студије је да се анализира повезаност експресије гена за COPB2 у ћелијама ендометријалног ткива са настанком карцинома ендометријума, код



експерименталне групе коју чине пацијенткиње са кариномом ендометријума и контролне групе коју чине пацијенткиње без карцинома ендометријума и атипичне хиперплазије.

За анализу значајне разлике експресије гена за *COPB2* у ћелијама ендометријалног ткива између испитаница из експерименталне и контролне групе, користимо *t* тест независних узорака. Усвајамо да је величина експерименталне групе дупло већа од величине контролне групе. За примену двостраног *t* теста независних узорака уз ниво значајности  $\alpha=0,05$ , снагу студије од минимално 0,8 (80%) и величину ефекта за велики утицај од 0,8 (узимамо препоручену вредност јер не постоје радови у којима се анализира експресија гена *COPB2* на појаву карцинома ендометријума) добијамо да је укупан број пацијенткиња 58, односно 39 пацијенткиња у експерименталној групи и 19 пацијенткиња у контролној групи.

Усвајамо величину узорка од 60 пацијенткиња, односно 40 пацијенткиња у експерименталној групи и 20 пацијенткиња у контролној групи.

#### **2.7.6. Статистичка обрада података**

Статистичка обрада података радиће се у програму *IBM SPSS Statistics v.20*. За опис непрекидних променљивих користиће се најмања и највећа вредност, као и средња вредност и стандардно одступање. За опис категоријских променљивих, користиће се апсолутне и релативне учесталости. За графички приказ категоријских променљивих користиће се кружни графикон.

За процену нормалности расподеле података користиће се *Shapiro-Wilk*-ов с обзиром на то да по групи има мање од 50 испитаница, и хистограм као графичка метода. Уколико подаци буду пратили нормалну расподелу, за њихову анализу користиће се *t* тестови а у супротном њихови непараметарски еквиваленти.

За тестирање значајности разлике између две групе користиће се *t* тест независних узорака, уколико подаци прате нормалну расподелу, односно *Mann-Whitney* тест уколико подаци не прате нормалну расподелу. За тестирање значајности разлике између више од две групе користиће се једнофакторска *ANOVA* различитих група уколико подаци прате нормалну расподелу, односно *Kruskal-Wallis*-ов тест уколико подаци не прате нормалну

расподелу. Значајни резултати ће се приказати коришћењем стубичастих, односно кутијастих графикана.

За анализу повезаности између две категоријске променљиве користиће се хи-квадрат тест, односно у случају мањих учесталости по категоријама Фишеров тест. Уз ове тестове, приказиваће се табеле са апсолутним и релативним учесталостима по појединим категоријама. За графичко приказивање значајних резултата користиће се стубичасти кластер графикон.

За предвиђање настанка карцинома ендометријума на основу више карактеристика испитаница, користиће се бинарна логистичка регресија. За предвиђање критичне вредности повећане експресије *COPB 2* и њене улоге у настанку карцинома ендометријума на основу више карактеристика испитаница, користиће се вишеструка логистичка регресија. Њеном применом покушаћемо да пронађемо најоптималнији број променљивих који ће дати задовољавајућу тачност модела, као и променљиву која има највећи јединствени допринос предвиђању исхода.

Резултати се сматрају значајним уколико је  $p$  вредност мања од 0,05.

## **2.8. Очекивани резултати докторске дисертације**

Очекујемо да постојање поремећаја регулације апоптозе и повећане експресије гена за *COPB2* значајно повећава вероватноћу појаве карцинома ендометријума. Тиме би ова студија пружила одговор о улози поремећаја регулације апоптозе и повећане експресије гена за *COPB2* у ћелијама ендометријалног ткива у настанку карцинома ендометријума.

Позитивни резултати који би се добили из овог истраживања били би употребљени у научне сврхе, са надом да ће касније наћи начин примене и у клиничкој пракси.

## **2.9. Оквирни садржај докторске дисертације**

Узимало би се ткиво ендометријума од пацијенткиња експерименталне и контролне групе које испуњавају укључујуће, а немају ни један искључујући фактор. Методом реверзне транскрипције квантитативног PCR-а (reverse transcription-quantitative PCR / RT-qPCR)

утврђивала би се експресија гена за COPB2 и протеин bcl-2 у ћелијама ендометријалног ткива у експерименталној и контролној групи. Испитивала би се улога поремећаја регулације апоптозе преко протеина bcl-2, као и експресије гена за COPB2 у настанку карцинома ендометријума.

Ова експериментална студија пружила би одговор о евентуалној повезаности поремећаја регулације апоптозе и повећане експресије гена за COPB2 у настанку карцинома ендометријума.

### 3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се доц. др Петар Арсенијевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство.

Доц. др Петар Арсенијевић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

#### 3.1 Компетентност ментора

Радови доц. др Петра Арсенијевића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. **Petar Arsenijević**, Slobodan Arsenijević, Janko Đurić, Miloš Milosavljević, Slobodanka Mitrović *Synchronous primary ovarian endometrioid carcinom and poorly differentiated endometrial stromal sarcoma* Serbian Journal of Clinical and Experimental research 2012; 13(4): 139-144.
2. Zoran Protrka, Slobodan Arsenijević, **Petar Arsenijević**, Slobodanka Mitrović, Vesna Stanković, Miloš Milosavljević, Jasmina Nedović, Tatjana Kastratović, Janko Đurić *Prognostic significance of co-overexpression of bcl-2 and c-erbB-2/neu in uterine cervix carcinomas and premalignant lesions* Medicinski glasnik Lekarske komore Zeničko - Dobojačkog kantona 2012; 9(2): 248-255.

3. Kastratovic, T., Zivanovic, A., Protrka, Z., & Arsenijevic, P. (2012). 112 Ovarian tumors and the manner of their surgical treatment in GOC Kragujevac Serbia. *Maturitas*, 71, S54.
4. **П. Арсенијевић**, А. Живановић, А. Димитријевић, Н. Јовић, С. Мујковић *Употреба контрастом побољшаног ултразвука у дијагностици карцинома ендометријума* 60. Гинеколошко акушерска недеља. Београд 2016; Зборник радова: 519-522.
5. Branko Andrić, **Petar Arsenijević**, Nikola Jović, Neda Arsenijević, Zoran Protrka *Juvenile type granulosa cell tumor* Journal of Clinical and Experimental research DOI: 10.15115/sjecr-2017-0017.

#### 4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Гинекологија и акушерство; Хумана репродукција и развој.

#### 5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Александар Живановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, председник;
2. **Др Данијела Цветковић**, научни сарадник, Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу, научна област *Биологија*, члан;
3. **Проф. др Ана Митровић Јовановић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, члан.

## ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, Бранко Андрић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Бранка Андрића, под називом: “Улога експресије **СОРВ2** и процеса апоптозе у настанку карцинома ендометријума“ и одобри њену израду.

## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

**Проф. др Александар Живановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*,  
председник

  
\_\_\_\_\_

**Др Данијела Цветковић**, научни сарадник, Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу, научна област *Биологија*, члан

  
\_\_\_\_\_

**Проф. др Ана Митровић Јовановић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, члан

  
\_\_\_\_\_

У Крагујевцу, 02.12.2019. године

