

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМЉЕНО	15.05.2019.
Одбор	
05	6089/2-1

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-353/33 од 17.05.2018. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Браниславе Ранковић** под називом:

“Значај епително-мезенхималне транзиције у колоректалној карциногенези“

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

1. Проф. др Мирко Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник
2. Проф. др Милан Кнежевић, редовни професор – у пензији Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Патолошка анатомија*, члан;
3. Доц. др Миљан Крстић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Патологија*, члан;

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Бранислава Ранковић** 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

Бранислава Ранковић је рођена 13.6.1980. године у Нишу, Србија. На Медицинском факултету Универзитета у Нишу на одсеку медицина 2004. године стекла је звање доктора медицине, док је 2008. године на одсеку стоматологија стекла звање доктора стоматологије. 2009. године уписала је специјализацију из области патологије, а специјалистички испит положила 19.06.2014. године. Као специјализант патологије радила је на Универзитетском клиничком центру Марибор у Словенији, а као специјалиста патологије на Институту за патологију на Медицинском факултету Универзитета у Љубљани, Словенија. Тренутно ради као вођа одељења за патологију хепатобилијарног тракта на Институту за патологију Медицинског факултета Универзитета у Љубљани, Словенија. Од 2014. године ради као асистент на предмету патологија на Медицинском факултету Универзитета у Љубљани. Учествовала је на више научних конгреса у земљи и иностранству.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: “Значај епително-мезенхималне транзиције у колоректалној карциногенези“

Предмет: Испитивање дијагностичког и прогностичког значаја епително-мезенхималне транзиције у колоректалној карциногенези.

Хипотезе:

1. Епително-мезенхимална транзиција је важан механизам у развоју колоректалног карцинома из аденома, као и у прогресу колоректалног карцинома (нпр. код метастазирања и инвазији серозе).

2. Епително-мезенхимална транзиција може помоћи код разликовања аденома, аденома са псеудоинвазијом и колоректалног карцинома.
3. Маркери епително-мезенхималне транзиције се могу користити код проблематичних случајева, посебно у диференцијацији аденома са псеудоинвазијом и колоректалног карцинома.
4. Епително-мезенхимална транзиција се може користити као маркер напредног колоректалног карцинома.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Бранислава Ранковић, је објавила 1 рад у целини у часопису категорије M23, у коме је први аутор, чиме је стекла услов за пријаву теме докторске дисертације.

Ranković B, Limbaeck-Stokin C, Đokić M, Stanisavljević D, Volavšek M. Simultaneous occurrence of pancreatic mixed acinar-ductal adenocarcinoma and primary follicular lymphoma of the duodenum, accompanied by increased number of IgG4 plasma cells in tumor-free parenchyma as concomitant IgG4-related disease or reaction to tumor? A case report. *Pol J Pathol.* 2017; 68(1): 86-91. **M23**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Колоректални карцином (CRC) је трећи најчешћи малигни тумор и четврти најчешћи узрок смртних случајева везаних за рак. Канцерогенеза CRC-а је подељена у пет дискретних стадијума, од нормалне слузокоже до аденома и инвазивног карцинома. Већине CRC-а се развија из прекурсорских лезија – аденоми. У напредним стадијумима, CRC-и метастазирају у регионалне лимфне чворове и друге органе. Неки молекуларни путеви канцерогенезе CRC-а су добро познати и укључују степенасту акумулацију мутација, епигенетске промене и промене у експресији гена, што доводи до неконтролисане ћелијске поделе и инвазивног фенотипа. Епително-мезенхимална транзиција (EMT) такође се појавила као потенцијални механизам који доприноси развоју и напредовању CRC-а.

У рутинском дијагностичком раду изузетно је важна дијагноза аденома, аденома са псеудоинвазијом и колоректалног карцинома, што омогућава избор оптималног третмана. Ендоскопско уклањање је третман избора за аденоме и аденоме са псеудоинвазијом, јер ове лезије не метастазирају и није потребно додатно хируршко лечење. Насупрот томе, малигни аденоми (рани карцином) су способни да метастазирају. Због тога је важно проценити ризик за развој метастаза и додатно третирати ове пацијенте који подразумева ресекцију сегмента дебелог црева заједно са регионалним лимфним чворовима. Упркос прецизној оцени патоморфолочких промена, разликовање таквих лезија може некада бити проблематично.

2.5. Значај и циљ истраживања

Имајући у виду инциденцију оболевања од карцинома колоне, као и смртност од ове врсте карцинома, испитивање молекулских путева којима се преканцерозне лезије преводе у карцином, као и потенцијалних маркера који би омогућили разликовање ових лезија је од великог медицинског значаја.

Циљеви истраживања подразумевају:

1. Анализирати епително-мезенхималну транзицију у различитим фазама колоректалне канцерогенезе користећи miRNK и њихове постулиране мете као маркере епително-мезенхималне транзиције.
2. Утврдити да ли се било која од истражених miRNK и њихових мета могу користити као дијагностички и прогностички маркери.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Молекуларни путеви, одговорни за трансформацију аденома у карцином, релативно су добро дефинисани. Међутим, маркери који би помогли у разликовању аденома, аденома са псеудоинвазијом и различитим стадијумима CRC-а још увек нису у потпуности дефинисани. По нашем сазнању нема података који се односе на могуће укључивање ЕМТ-а, нарочито у раним стадијумима колоректалне канцерогенезе.

У нашим недавним студијама, miRNK miR-141, miR-200a/b/c и miR-429 су показани као корисни маркери ЕМТ-а у малигним неоплазмама и упалама. Стога ћемо анализирати експресију ових miRNK и њихових постулираних мета (ZEB1, ZEB2, SOX-2, FAP-1, TGFb2 и Opesut2) у аденомима, аденомима са псеудоинвазијом као и раним и касним стадијумима CRC-а да би се тестирала хипотеза да је ЕМТ важан механизам у колоректалној канцерогенези.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Епително-мезенхимална транзиција.

2.7.2. Популација која се истражује

Студија би обухватила 60 пацијената, који су хируршки лечени (ресекција тумора и регионалних лимфних чворова за CRC и ексцизија аденома).

2.7.3. Узорковање

Пацијенти ће бити подељени у 6 група:

Група 1 (CRC Н0): 10 пацијената са CRC без метастаза у регионалним лимфним чворовима,

Група 2 (CRC Н+): 10 пацијената са CRC са метастазама у регионалним лимфним чворовима,

Група 3 (CRC Т4): 10 пацијената са CRC са инвазијом у серозу (пТ4),

Група 4 (Аденоми): 10 пацијената са тубуларним и тубуловилозним аденомима,

Група 5 (Малигни аденоми): 10 пацијената са малигним аденомима (аденокарцином са субмукозном инвазијом, пТ1),

Група 6 (Аденоми са псеудоинвазијом): 10 пацијената са аденомом са псеудоинвазијом.

2.7.4. Варијабле

Узорци ткива узети за хистолошки преглед ће бити фиксирани у 10% пуферисаном формалину, укалупљени у парафин и резани на 4 микрона. У сврху ове студије ће бити

прегледани сви ХЕ препарати и за сваког пацијента ће бити изабрани најоптималнији узорци (ХЕ препарати) са одговарајућим парафинским блоковима за додатне анализе (имунохистохемија и кРСР).

Имунохистохемија

За имунохистохемију ће бити коришћена комерцијално доступна антитела за Е-кадхерин и репресори транскрипције, нпр. ZEB1 и ZEB2 (коначна одлука о избору маркера базираће се на резултатима кРСР). Бојење антитела биће изведено у аутоматском имуностаинеру (*Discoveri, Ventana, Ticsion, Arizona, SAD*). Узорци ће бити третирани секундарним биотинилованим антителима, након чега ће следити инкубација са пероксидазом коњугираним стрептавадином. Визуелизација имунореактивности вршиће се помоћу 3,3'-диаминобензидина. На крају, ће узорци бити контрастирани хематоксилином.

Изолација RNK

Изолација RNK ће се обављати из узорка ткива која су била фиксирана у формалину и уграђена у парафин (енгл. *Formalin-fixed paraffin-embedded tissue, FFPE*) помоћу сетова *AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen)* према протоколу произвођача. Количина RNK биће процењена помоћу спектрофотометра ND-1000 (*Nanodrop*).

qPCR

mRNK и miRNK експресијске разлике ће се упоређивати између тумора (CPC H0, CPC H+, CPC T4) и ткива без патоморфолошких промена (непосредно уз тумор) или као независна група узорака (аденоми, аденоми са псеудоинвазијом, малигни аденоми, нормално ткиво). RNK ће бити транскрибован за miRNK (TaqMan, Applied BioSystems) и за mRNK (OneTaq, NEB) експресијске анализе.

Експресија изабраних гена у узорцима тумора, у околном ткиву без патоморфолошких промена и аденомима ће се измерити помоћу квантитативног PCR-а у реалном времену, базирано на TaqMan® флуоресцентној методологији. Користиће се припремљена мешавина сонди и прајмера (Pre-developed TaqMan Assays) специфичних за miRNK (miR-141, miR-200a /b /c, miR-429) и mRNK (ZEB1, ZEB2, SOKS-2, FAP-1,

TGFB2, Opesut2). Изражавање miRNK и mRNK биће измерено релативно према одговарајућим ендогеним референтним генима (RGs).

Резултат анализе ΔCt (нормализован Ct miRNK и mRNK на RGs) биће коришћен за анализу експресије. Релативна квантификација нормализованих нивоа mRNK (количина транскрипта у туморима у односу на нормална ткива) биће одређена методом $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt тумор- ΔCt нормала). Ако ће $\Delta\Delta Ct$ бити значајно (2σ) веће или мање од нуле, изражавање ће се сматрати статистички значајно као прекомерно или недовољно изражено.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Укупни узорак је прорачунат на основу резултата претходно објављене студије. За прорачун је коришћен t-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма. Узимањем у обзир резултате наведене студије, укупан број је прорачунат на 60 пацијената (шест група, свака обухвата по 10 пацијената).

2.7.6. Статистичка обрада података

Статистичка анализа ће бити обављена коришћењем софтверског пакета SPSS верзија 24 (SPSS Inc). Упоредивање експресије гена између тумора и нормалног ткива вршиће се помоћу теста Willcoxon Rank, а између аденома и нормалног ткива помоћу теста Mann-Whitney. Pearson-ова корелациона анализа ће се користити за процену корелације израза између две варијабле. Разлике ће се сматрати значајним ако је $p < 0.05$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Експресија miRNK и транскрипцијских репресора значајно се разликују у аденомима и аденомима са псеудоинвазијом с једне стране, као и код CRC-а са и без метастаза у регионалним лимфним чворвима с друге стране. Експресија miRNK и транскрипцијских репресора је различита у CRC са метастазама у поређењу са онима без метастаза, као и код CRC са серозном инвазијом у поређењу са CRC без серозне инвазије. miRNK и транскрипцијски репресори могу се користити као дијагностички и прогностички маркери у колоректалној канцерогенези.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Оригинални научни допринос и значај предложеног испитивања посебно се односи на испитивање могућности одређивања miRNK и доказивања различитих нивоа експресије у појединим облицима преканцерозних и канцерозних лезија колоректалне регије. Имајући у виду социомедицински и социоекономски значај карцинома колона испитивање дијагностичких и прогностичких маркера има огроман значај, чиме би се омогућило адекватно планирање тераписјких процедура и прилагођавање сваком пацијенту.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се проф. др Нина Зидар, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Љубљани за ужу научну област Патологија.

Проф. др Нина Зидар поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњавају услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

1.1 Компетентност ментора

Радови проф. др Нине Зидар који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Boštjančič E, Brandner T, **Zidar N**, Glava D, Štajer D. Down-regulation of miR-133a/b in patients with myocardial infarction correlates with the presence of ventricular fibrillation. *Biomed Pharmacother.* 2018; 99: 65-71.
2. **Zidar N**, Boštjančič E, Malgaj M, Gale N, Dovšak T, Didanovič V. The role of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Virchows Arch.* 2018; 472(2): 237-245.
3. **Zidar N**, Langner C, Odar K, Hošnjak L, Kamarádová K, Daum O, Pollheimer MJ, Košorok P, Poljak M. Anal verrucous carcinoma is not related to infection with human

papillomaviruses and should be distinguished from giant condyloma (Buschke-Löwenstein tumour). *Histopathology*. 2017; 70(6): 938-945.

4. **Zidar N**, Boštjančič E, Jerala M, Kojc N, Drobne D, Štabuc B, Glavač D. Down-regulation of microRNAs of the miR-200 family and up-regulation of Snail and Slug in inflammatory bowel diseases - hallmark of epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Mol Med*. 2016; 20(10): 1813-20.
5. Gale N, Gnepp DR, Poljak M, Strojjan P, Cardesa A, Helliwell T, Šifrer R, Volavšek M, Sandison A, **Zidar N**. Laryngeal Squamous Intraepithelial Lesions: An Updated Review on Etiology, Classification, Molecular Changes, and Treatment. *Adv Anat Pathol*. 2016; 23(2): 84-91.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином

5. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Мирко Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник
2. Проф. др Милан Кнежевић, редовни професор – у пензији Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Патолошка анатомија*, члан;
3. Доц. др Миљан Крстић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Патологија*, члан;

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, Бранислава Ранковић, 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.

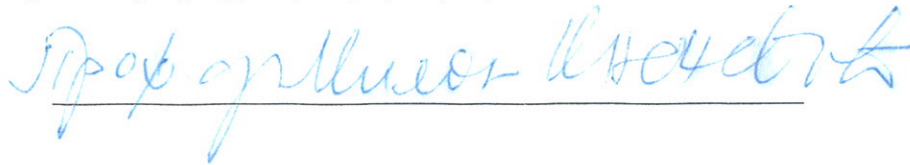
Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Браниславе Ранковић, уз корекцију наслова, тако да гласи: “**Значај епително-мезенхималне транзиције у колоректалној карциногенези**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

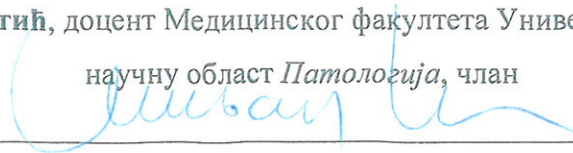
Проф. др Мирко Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник



Проф. др Милан Кнежевић, редовни професор – у пензији Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Патолошка анатомија*, члан



Доц. др Миљан Крстић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Патологија*, члан



У Крагујевцу, 29.05.2018. године