

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
КРАГУЈЕВАЦ**

**1. ОДЛУКА НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА**

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-4869/3-7 од 29.05.2013. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др мед. Миљана Фолића, под називом:

**„УТИЦАЈ ПОЛИМОРФИЗАМА P582S И A588T ГЕНА ЗА HIF-1 $\alpha$  НА ЕКСПРЕСИЈУ ПРОТЕИНА HIF-1 $\alpha$  И VEGF У ПЛАНОЦЕЛУЛАРНИМ КАРЦИНОМИМА ГЛАВЕ И ВРАТА“**

На основу одлуке Наставно-научног већа формирана је Комисија у саставу:

- 1. Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, председник
- 2. Проф. др Војко Ђукић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Оториноларингологија са максилофацијалном хирургијом, члан
- 3. Проф. др Светозар Дамјановић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област интерна медицина, члан.

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

**ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ НАУЧНЕ ЗАСНОВАНОСТИ ТЕМЕ ДОКТОРСKE  
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Кандидат др мед. Миљан Фолић испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета Медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

**2.1. КРАТКА БИОГРАФИЈА КАНДИДАТА**

Др Миљан Фолић је рођен 26.07.1981. године у Крагујевцу где је завршио Основну школу и Прву крагујевачку гимназију као носилац Вукове дипломе. Основне студије Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу је уписао 2000. године и дипломирао 2. марта 2007. година са просечном оценом 10. Академске 2007/2008. године уписао је Докторске академске студије на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу, смер клиничка и експериментална хирургија. Положио је све програмом студија предвиђене испите, као и усмени докторантски испит јуна 2009. године са оценом 10. Запослен је као лекар на специјализацији у Клиници за оториноларингологију и максилофацијалну хирургију Клиничког центра Србије у Београду.

Аутор је или коаутор већег броја радова објављених у целини у домаћим и интернационалним часописима. Учествовао је на симпозијумима и конгресима

посвећеним разноврсној тематици из области оториноларингологије. Члан је Европског ринолошког друштва (ERS).

## 2.2. НАСЛОВ, ПРЕДМЕТ И ХИПОТЕЗЕ ДОКТОРСКЕ ТЕЗЕ

### Наслов:

„Утицај полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 $\alpha$  на експресију протеина HIF-1 $\alpha$  и VEGF у планоцелуларним карциномима главе и врата"

### Предмет:

Ова студија ће се бавити утврђивањем полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 $\alpha$  код пацијената који болују од планоцелуларног карцинома главе и врата и њиховом повезаношћу са нивоима експресије протеина HIF-1 $\alpha$  и VEGF, као и са патолошким карактеристикама ових карцинома.

### Хипотезе:

1. Патолошке карактеристике планоцелуларних карцинома главе и врату су екстензивније код пацијената са утврђеним полиморфизмом P582S или A588T гена за HIF-1 $\alpha$ .
2. Код пацијената са полиморфизмом P582S или A588T гена за HIF-1 $\alpha$  повишен је ниво експресије HIF-1 $\alpha$  у планоцелуларним карциномима главе и врата.
3. Код пацијената са полиморфизмом P582S или A588T гена за HIF-1 $\alpha$  повишен је ниво експресије VEGF у планоцелуларним карциномима главе и врата.

## 2.3. ПОДОБНОСТ КАНДИДАТА

Кандидат др Миљан Фолић је као први аутор објавио рад у целини у научном часопису са рецензијом, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

- **Folić M.** Djukić-Dejanović S, Djurdjević P. Andjelković N. Milovanović D. Hematološki parametri tokom lečenja risperidonom i sertralinom: pilot studija preseka. Pons 2007; 10: 5-10 (Није на листи МНО за 2007. годину - 0 бодова)

Остали радови објављени у научним часописима:

1. Milovanović J, Milovanović A, Milovanović A, Ješić S, Jotić A, Čemerikić D, Artiko V, Petrović M, Pavlović B, **Folić M.** Effect of acute experimental aluminium poisoning on hematologic parameters. Acta Veterinaria 2012; 62(2-3): 183-92. **(M23 - 3 бода)**
2. Djukić V, Milovanović J, Milovanović A, Stanković P, Pavlović B, **Folić M,** Blazić S. Laser surgery of supraglottic laryngeal carcinoma. Acta Chir Jugosl. 2009; 56(3):85-8. **(M51 - 2 бода)**
3. Djukić V, Vukasinović M, Stanković P, Milovanović J, **Folić M.** What do we need to help laryngectomized speaking. Acta Chir Jugosl. 2009; 56(3): 11-5. **(M51 - 2 бода)**
4. Gajić J, Zornić N, **Folić M,** Ružić-Zečević D. Serum levels of urea and creatinine in patients before and after spinal anesthesia. Medicus 2005; 6(2): 86-8. **(M52 - 1.5 бод)**
5. **Folić M,** Gajić J, Milovanović D. Palpable pruritic purpura probably associated with a calcium channel blocker - case report. Medicus 2005; 6(2): 89-91. **(M52 - 1.5 бод)**

## 2.4. ПРЕГЛЕД СТАЊА У ПОДРУЧЈУ ИСТРАЖИВАЊА

Фактор индукован хипоксијом (Hypoxia-inducible factor, HIF-1) се сматра кључним регулатором ћелијског одговора на хипоксију, подлежући конформационим променама као одговор на различите концентрације кисеоника у ћелијском окружењу. То је транскрипциони фактор који се састоји из две субјединице: HIF-1 $\alpha$ , која се детектује у хипоксичним условима и HIF-1 $\beta$  која је константно присутна у ћелијама. У условима

нормалног парцијалног притиска кисеоника, HIF-1 $\alpha$  подлеже деградацији, док у хипоксији настаје акумулација овог протеина. Идентификовано је преко 60 циљних гена који су индуковани активношћу HIF-1 и са којим су укључени у ћелијски одговор на хипоксичне услове и туморски раст. Један од главних је VEGF (Vascular endothelial cell growth factor) који делује пролиферативно на ендотелне ћелије у хипоксичним и аваскуларним подручјима.

Бројне студије показују значајну повезаност између повећане експресије протеина HIF-1 $\alpha$  и ћелијске пролиферације, величине тумора, метастазирања, као и прогнозе различитих малигних тумора људског организма, а међу њима и планоцелуларних карцинома усне шупљине. Овај протеин се зато сматра фактором за процену ризика од настанка карцинома и предиктором њихове агресивности. Више истраживања испитивало је улогу полиморфизама у гену за HIF-1 $\alpha$  у посредовању генетске предиспозиције за карциноме. Највише су испитана два полиморфизма екзона 12 хуманог HIF-1 $\alpha$  гена означени као P582S и A588T. Резултати већином говоре да ова два полиморфизма значајно повећавају транскрипциону активност HIF-1 $\alpha$  и тако повећавају ризик од настанка карцинома, али објављено је и да код неких врста глиома и карцинома бубрега, активација HIF-а може парадоксално утицати на супресију раста тумора. Место које HIF-1 $\alpha$  заузима у карциногенези, као и утицај полиморфизама на експресију HIF-1 $\alpha$  и VEGF и повезаност са патолошким карактеристикама онколошких пацијената је и даље предмет контраверзи. Од наредних студија се очекује да истраже његову потенцијалну улогу циљног гена у терапији карцинома.

## **2.5. ЗНАЧАЈ И ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА СА СТАНОВИШТА АКТУЕЛНОСТИ У ОДРЕЂЕНОЈ НАУЧНОЈ ОБЛАСТИ**

Више аутора је известило да постојање полиморфизама P582S или A588T хуманог гена за HIF-1 $\alpha$  утичу на екстензивност клиничке слике онколошких пацијента, као и на смањење одговора тумора на специфично онколошко лечење. Основни циљ студије је да испита утицај ових полиморфизама на ниво експресије протеина HIF-1 $\alpha$  и VEGF, као и на патолошке карактеристике карцинома главе и врата. Детекција поменутих полиморфизама ће се радити на узорцима крви и тумора, па се отвара могућност открића *de novo* мутација, чија би улога у настанку тумора могла бити испитана даљим истраживањима. Параметри од значаја ће се испитивати код планоцелуларних карцинома различите локализације у читавој регији главе и врата. Од значаја је да ће се у току имунохистохемијског испитивања експресије појединачних маркера HIF-1 $\alpha$  и VEGF користити дупло имунохистохемијско бојење које ће омогућити истовремену експресију оба поменута маркера на истом ткивном пресеку.

Детекција полиморфизама P582S или A588T гена за HIF-1 $\alpha$  и одређивање нивоа експресије HIF-1 $\alpha$  и VEGF би могли бити показатељ агресивности планоцелуларних карцинома главе и врата и могли би да имају значајан утицај на избор терапије тумора. Они представљају корак напред у персоналном приступу сваком пацијенту и његовој болести.

## **2.6. БЕЗА СА ДОСАДАШЊИМ ИСТРАЖИВАЊИМА**

Највећи број студија које су испитивале улогу нивоа експресије HIF-1 $\alpha$  у карциногенези односи се на карциноме уринарног тракта, затим материце, колона и једњака, мада се у стручној литератури могу наћи и резултати истраживања код карцинома усне дупље. Група истраживача из Јапана на челу са Taninamoto K. изнела је податке према којима полиморфизми P582S и A588T значајно повећавају транскрипциону активност и ниво експресије HIF-1 $\alpha$  код оралних карцинома са хетерозиготним аелима. Munoz-Guerra и сарадници су 2009. године објавили да полиморфизми у гену HIF-1 $\alpha$  могу значајно повећати ризик од настанка оралних карцинома и да могу бити показатељ

неповољне прогнозе у ранијим стадијумима болести. Ова студија је указала на корелацију А588Т полиморфизма гена за HIF-1 $\alpha$  са појавом релапса малигне болести и смањеним временом преживљавања пацијената.

Истраживањем које је предмет ове докторске тезе били би испитивани карциноми читаве регије главе и врата. Мерећи експресију протеина VEGF и одређивањем волуменске густине крвних судова у туморском ткиву, био би процењен утицај поменутих полиморфизама на развој микроваскуларне мреже тумора.

## **2.7. МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА**

### **А. ВРСТА СТУДИЈЕ**

Истраживање ће се обавити у виду клиничке опсервационе студије пресека оболелих од планоцелуларног карцинома регије главе и врата.

### **Б. ИСПИТАНИЦИ**

Испитивањем биће обухваћени испитаници подељени у две групе. Прва група биће студијска група испитаника оболелих од планоцелуларног карцинома регије главе и врата (С1), док ће друга група бити контролна (К), сачињена од здравих добровољаца. Након секвенцирања, студијска група биће подељена у две подгрупе: групу испитаника са једним или оба поменута полиморфизма (С2) и група испитаника без полиморфизма (С3) између којих ће се испитивати разлика у патолошким карактеристикама, као и нивоима експресије HIF-1 $\alpha$  и VEGF.

Студијску групу чиниће пацијенти оболели од планоцелуларног карцинома регије главе и врата код којих је сходно одлуци онколошког конзилијума планирано спровођење хируршког лечења. Пацијенти ће бити издвојени из популације пацијената оба пола, са територије републике Србије, хоспитално лечених на Клиници за оториноларингологију и максилофацијалну хирургију Клиничког центра Србије у периоду од јануара до октобра 2013. године, а који испуњавају критеријуме предвиђене протоколом испитивања.

Критеријуми за укључивање пацијента у студију:

- Потписана изјава о добровољном учествовању у испитивању
- Патохистолошки верификован планоцелуларни карцином регије главе и врата
- Одлука Конзилијума за малигне туморе оториноларинголошке и максилофацијалне регије о хируршком лечењу примарног тумора

Критеријуми за неукључивање пацијента у студију:

- Анестезиолошка неподобност за хируршку интервенцију
- Величина или локализација примарног тумора који не дозвољавају узорковање туморског ткива
- Претходно спроведено специфично онколошко лечење тумора зрачном или хемиотерапијом
- Постојање тумора друге регије организма, тј. „дуплекс тумори“.

Контролну групу испитаника чиниће 100 здравих добровољаца, оба пола, са територије Републике Србије, који испуњавају критеријуме предвиђене протоколом испитивања, при чему ће се водити рачуна да припадници контролне групе одговарају студијској групи према социо-епидемиолошким карактеристикама (узраст, пол, телесна тежина, пушачки статус).

Сврха постојања ове контролне групе је упоређивање учесталости генотипова полиморфизама P582S и А588Т гена за HIF-1 $\alpha$  са испитаницима из студијске групе.

## **В. УЗОРКОВАЊЕ**

Испитаници студијске групе биће издвојени методом пригодног узорковања из популације пацијената оболелих од планоцелуларног карцинома главе и врата, хоспитално лечених на Клиници за оториноларингологију и максилофацијалну хирургију Клиничког центра Србије. Даља подела у групе испитаника са и без полиморфизама вршиће се након секвенцирања PCR методом.

Испитаници контролне групе биће издвојени из популације методом пригодног узорковања. Испитаници студијске и контролне групе биће усклађени према полу, старости и пушачком статусу.

Испитаницима студијске групе током операције биће узета 2 репрезентативна узорка туморског ткива као и периферна венска крв у количини од 5 mL. Један узорак послужиће за утврђивање постојања полиморфизама, а други се упућује на имунохистохемијску анализу. Испитаницима контролне групе биће узимана периферна венска крв у истој количини као и у студијској групи, након потписивања информисаног пристанка.

Утврђивање постојања полиморфизама вршиће се PCR методом којом је амплификован фрагмент хуманог HIF-1 $\alpha$  гена дужине 178 базних парова. У циљу доказивања експресије HIF-1 $\alpha$  и VEGF имунохистохемијским методама, користиће се мишје моноклонско анти-хумано антитело на HIF-1 $\alpha$  произвођача *Abcam*, Cambridge, UK) и кунџево поликлонско анти-хумано антитело на VEGF (произвођача *Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz, California, USA; sc-152). У току имунохистохемијског испитивања експресије HIF-1 $\alpha$  и VEGF примениће се екстремно сензитивна и специфична имунохистохемијска метода *EnVision<sup>+</sup> Dual Link System/HRP* (произвођача *DakoCytomation*, Carpinteria, California, USA; Code K4065). Такође, примениће се и дупло имунохистохемијско бојење које ће омогућити истовремену експресију на истом ткивном пресеку HIF-1 $\alpha$  и VEGF, применом *EnVision<sup>TM</sup> G/2 Doublestain System, Rabbit/Mouse* (*DakoCytomation*, Carpinteria, California, USA; Code K5361). Индекс експресије HIF-1 $\alpha$  у туморским ћелијама биће прорачунат као број ћелија са експримираним HIF-1 $\alpha$  на 1.000 туморских ћелија. Такође, одредиће се и процентуални однос обојених туморских ћелија које експримирају HIF-1 $\alpha$  у нуклеусу и оних које експримирају HIF-1 $\alpha$  у цитоплазми. Волуменска густина крвних судова биће одређивана употребом тестног поља које ће покривати цео посматрани препарат тумора.

## **Г. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЕРЕ У СТУДИЈИ**

### **Независне варијабле:**

- Присуство планоцелуларног карцинома регије главе и врата - дихотомна квалитативна варијабла, потврђује се патохистолошким анализом.
- Стадијум малигне болести - номинална квалитативна варијабла, одређује се према критеријумима 7. издања TNM класификације (UICC).
- Присуство полиморфизама P582S или A588T у гену за HIF-1 $\alpha$  - номинална квалитативна варијабла, одређује се PCR методом.

### **Зависне варијабле:**

- Ниво експресије HIF-1 $\alpha$  - континуална нумеричка варијабла, изражава се кроз индекс експресије који је прорачунат као број ћелија са експримираним HIF-1 $\alpha$  на 1.000 туморских ћелија.
- Ниво експресије VEGF - континуална нумеричка варијабла.
- Волуменска густина крвних судова

## Д. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА

Величина узорка израчуната је на основу студије Shieh TM et al. из 2010. године. На основу учесталости појаве полиморфизама HIF-1 $\alpha$ , код испитаника са малим туморима која је била 10,32% и учесталости код великих тумора која је износила 18,44%, потребна величина узорка за ниво значајности  $\alpha=0,05$  и статистичку моћ теста  $1-\beta$  од 80% израчуната је потребна величина узорка од 90 испитаника.

## Ђ. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка обрада резултата ће обухватити методе дескриптивне статистике и тестирања хипотезе независних узорака. У приказу резултата користиће се мере централне тенденције и мере варијабилитета у складу са типом расподеле. Резултати ће бити приказани и табеларно и графички. Врста статистичких тестова ће бити условљена карактером прикупљених података (категоријалне или нумеричке варијабле) и типом њихове расподеле. За поређење просечних вредности параметарских обележја употребљаваће се неупарени Студентов Т-тест, а за поређење разлике између учесталости код непараметријских података користиће се  $\chi^2$  тест. Разлика у компарираним подацима ће се сматрати статистички значајном ако је вероватноћа нулте хипотезе мања од 5 % ( $p<0.05$ ). Корелација између полиморфизама и клиничко-патолошких карактеристика тумора биће анализирана бинарном логистичком регресијом, одређивањем количника шансе и интервала поверења.

### 2.8. ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Од студије се очекује да укаже на повезаност постојања полиморфизама P582S и A588T у гену за HIF-1 $\alpha$  са нивоима експресије HIF-1 $\alpha$  и VEGF и патолошком сликом пацијената који болују од планоцелуларног карцинома главе и врата. Такође очекује се да резултати студије дају одређени допринос у спознавању улоге гена за HIF-1 $\alpha$  у настанку и развоју планоцелуларних карцинома и процесу карциногенезе уопште. Уколико би биле детектоване *de novo* мутације у гену за HIF-1 $\alpha$  у узорцима тумора у односу на узорке крви, то би отворило могућности даљег испитивања настанка карцинома.

### 2.9. ОКВИРНИ САДРЖАЈ ДИСЕРТАЦИЈЕ

HIF-1 је протеински хетеродимер који има битну улогу у расту тумора и апоптози. Овај фактор је присутан у ћелијама изложеним хипоксичним условима и утиче на ангиогенезу и превођење ћелија на кисеонично независне метаболичке путеве. Он је транскрипциони фактор, а као један од главних циљних гена помиње се ген за VEGF. Тумори са повећаном експресијом HIF-1 $\alpha$  се одликују израженијом клиничком сликом и нижом стопом преживљавања пацијената. Полиморфизми P582S и A588T у гену за HIF-1 $\alpha$  могу утицати на ниво експресије овог гена.

Истраживање ће се обавити у виду клиничке опсервационе студије пресека оболелих од планоцелуларног карцинома главе и врата. Утврђивање постојања полиморфизама гена за HIF-1 $\alpha$  вршиће се PCR методом, а експресија HIF-1 $\alpha$  и VEGF доказиваће се имунохистохемијским методама.

Очекује се да у групи испитаника код којих је утврђен полиморфизам буде израженија експресија протеина HIF-1 $\alpha$ , као и VEGF. У истој групи очекују се екстензивније и патолошке карактеристике тумора.

Детекција полиморфизама P582S и A588T у гену за HIF-1 $\alpha$  и одређивање нивоа експресије би могли бити показатељ агресивности планоцелуларних карцинома главе и врата.

## 2.10 ИМЕ МЕНТОРА

Комисија предлаже за ментора ове докторске дисертације **Проф. др Војка Ђукића**, редовног професора Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Оториноларингологија са максилофацијалном хирургијом.

## 2.11. НАУЧНА ОБЛАСТ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Медицина. Ужа научна област: Онкологија

## 2.12. НАУЧНА ОБЛАСТ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

1. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, председник
2. **Проф. др Војко Ђукић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Оториноларингологија са максилофацијалном хирургијом, члан
3. **Проф. др Светозар Дамјановић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област интерна медицина, члан

## ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

1. На основу досадашњег научног рада и публикованих радова др мед. Миљан Фолић испуњава све услове прописане Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и Законом о високом образовању за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен, а научна методологија јасна и прецизна.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза бити од научног и практичног значаја у проналажењу нових показатеља агресивности планоцелуларних карцинома главе и врата, као и фактора са значајним утицајем на избор онколошке терапије.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др мед. Миљана Фолића под називом „**Утицај полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 $\alpha$  на експресију протеина HIF-1 $\alpha$  и VEGF у планоцелуларним карциномима главе и врата**“ и одобри њену израду.

## **ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ**

### **Проф. др Небојша Арсенијевић**

редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу  
за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, председник

---

### **Проф. др Војко Ђукић**

редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду  
за ужу научну област Оториноларингологија са максиларнофацијалном хирургијом, члан

---

### **Проф. др Светозар Дамјановић**

редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду  
за ужу научну област Интерна медицина, члан

---

Крагујевац,  
10.07.2013. године