



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Бранко М. Андрић

**УЛОГА ЕКСПРЕСИЈЕ СОРВ2 И ПРОЦЕСА
АПОПТОЗЕ У НАСТАНКУ КАРЦИНОМА
ЕНДОМЕТРИЈУМА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2024.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Branko M. Andrić

THE ROLE OF COPB2 EXPRESSION AND THE PROCESS OF APOPTOSIS IN THE GENESIS OF ENDOMETRIUM CARCINOMA

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024.

Аутор
Име и Презиме: Бранко Андрић
Датум и место рођења: 21.02.1983. године, Нови Пазар, Србија
Садашње запослење: лекар специјалиста гинекологије и акушерства у диспанзеру за здравствену заштиту жена Дом Здравља Рашка
Докторска дисертација
Наслов: Улога експресије СОРВ2 и процеса апоптозе у настанку карцинома ендометријума
Број страница: 60
Број слика: 2, број табела: 30, број графикана: 27
Број библиографских података: 96
Установа и место где је рад израђен: Клиника за гинекологију и акушерство, Универзитетски клинички центар Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина, Гинекологија и акушерство
Ментор: др сци. мед. Петар Арсенијевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: IV-03-209/13 од 11.03.2020. године.

Author
Name and surname: Branko Andrić
Date and place of birth: 21.02.1983., Novi Pazar, Serbia
Current employment: Gynecology specialist at the Community Health Centre Novi Pazar, Serbia
Doctoral Dissertation
Title: The Role Of COPB2 Expression And The Process Of Apoptosis In The Genesis Of Endometrium Carcinoma
No. of pages: 60
No. of images: 2 images, 30 tables, 27 graphs
No. of bibliographic data: 96
Institution and place of work: Gynecology clinic, University Clinical Center Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: title, name and surname, position, name of faculty / institute and university prof. Petar Arsenijević, associate professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Serbia
Topic Application Date: 02.12.2019.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-209/13 from 11.03.2020.

САЖЕТАК

У настанку карцинома ендометријума важну улогу имају гени задужени за синтезу протеина који учествују у ћелијским транспортним и метаболичким процесима. Протеини фамилије *Bcl-2* кључни су унутарћелијски модулатори процеса апоптозе. У до сада рађеним студијама доказан је значај *COPB2* у настанку и развоју аденокарцинома.

Циљ ове студије је испитати утицај поремећаја апоптозе и експресије гена за *COPB2* на настанак карцинома ендометријума.

Узимало се ткиво ендометријума од пацијенткиња експерименталне (40 испитаница) и контролне групе (20 испитаница). Методом реверзне транскрипције квантитативног *PCR*-а одређивала се релативна експресија гена за *COPB2* и протеин *Bcl-2* у ендометријалним ћелијама. Испитана је улога поремећаја регулације апоптозе преко *Bcl-2*, као и експресије гена за *COPB2* у настанку карцинома ендометријума.

Утврђено је да постоји статистички значајна разлика ($P < 0,005$) у вредностима експресије гена *COPB2* и *Bcl-2* између пацијенткиња са и без карцинома ендометријума. За оба гена је приказан значајан дијагностички потенцијал у раздвајању оболелих од здравих пацијенткиња, с' тим што је дијагностички потенцијал *COPB2* гена специфичнији. За *Bcl-2* површина испод криве (*AUC*) износи 0,666 и овај резултат је статистички значајан ($p = 0,038$). За *COPB2* површина испод криве (*AUC*) износи 0,877 и овај резултат је статистички значајан ($p = 0,000$).

Вредности релативне експресије *COPB2* и *Bcl-2* су снижене у почетним стадијумима карцинома ендометријума. Њихов поремећај може имати значајну улогу у настанку карцинома ендометријума.

Кључне речи: Карцином ендометријума, апоптоза, протеин *Bcl-2*, *COPB2*, квантитативни *PCR*.

SUMMARY

Genes responsible for the synthesis of proteins involved in cellular transport and metabolic processes play an important role in the development of endometrial carcinoma. Bcl-2 family proteins are key intracellular modulators of the apoptosis process. Previous studies have demonstrated the importance of COPB2 in the development and progression of adenocarcinoma.

The aim of this study is to examine the impact of apoptosis disorders and COPB2 gene expression on the development of endometrial carcinoma.

Endometrial tissue was taken from patients in the experimental group (40 patients) and the control group (20 patients). The relative expression of the COPB2 gene and Bcl-2 protein in endometrial cells was determined using the reverse transcription quantitative PCR method. The role of apoptosis regulation disorders via Bcl-2, as well as COPB2 gene expression in the development of endometrial carcinoma, was examined.

It was found that there is a statistically significant difference ($p < 0.005$) in COPB2 and Bcl-2 gene expression values between patients with and without endometrial cancer. For both genes, a significant diagnostic potential was shown in separating cancer patients from healthy patients, with the fact that the diagnostic potential of the COPB2 gene is more specific. For Bcl-2 area under the curve (AUC) is 0.666 and this result is statistically significant ($p = 0.038$). For COPB2 the area under the curve (AUC) is 0.877 and this result is statistically significant ($p = 0.000$).

The relative expression values of COPB2 and Bcl-2 are decreased in the initial stages of endometrial carcinoma. Their disorder can play a significant role in the development of endometrial cancer.

Key words: Endometrial carcinoma, apoptosis, protein Bcl-2, COPB2 quantitative PCR.

ЗАХВАЛНИЦА

Свом ментору проф. др Петру Арсенијевићу дугујем велику захвалност на добронамерним саветима, великом стрпљењу, као и труду и времену који је уложио при изради ове докторске дисертације.

Посебно се захваљујем проф. Данијели Цветковић без чије помоћи овај рад не би могао бити реализован.

Захваљујем Стефану Благојевићу који је својим знањем и несебичном помоћи омогућио реализацију дисертације.

Захваљујем особљу Клинике за гинекологију и акушерство Универзитетског клиничког центра у Крагујевцу, које ми је несебично помагало током израде тезе.

Бескрајна захваланост мојој породици, супрузи Јасни, деци Иви, Маши, Сари и Алекси, родитељима Миладину и Снежани, браћи Вељку и Душану за безрезервну подршку, сталну мотивацију и храбрење да истрајем на овом путу.

Захваљујем се и свима осталима који су на свој начин омогућили стварање ове тезе.

Овај рад посвећујем својој деци: Иви, Маши, Сари и Алекси, због времена које сам им „украо“... јер они свему дају смисао.

САДРЖАЈ

1 УВОД.....	1
1.1 Карцином ендометријума.....	1
1.1.1 Инциденца.....	1
1.1.2 Дефиниција.....	1
1.1.3 Етиопатогенеза.....	1
1.1.4 Дијагноза.....	2
1.1.5 Класификација.....	3
1.1.6 Терапија.....	4
1.1.7 Прогноза.....	4
1.1.8 Хиперплазија ендометријума.....	5
1.2 Апоптоза.....	5
1.2.1 Малигна трансформација ћелије.....	5
1.2.2 Процес апоптозе.....	5
1.2.3 <i>Bcl-2</i>	6
1.2.4 <i>COPB2</i>	6
2 ЦИЉЕВИ И МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА.....	7
2.1 Циљ студије.....	7
2.2 Хипотезе студије.....	7
2.3 Материјал и методе рада.....	7
2.3.1 Врста студије.....	7
2.3.2 Популација која се истражује.....	8
2.3.3 Узорковање.....	8
2.3.4 Генетска обрада материјала.....	9
2.3.4.1 Изолација РНК (рибонуклеинске киселине) из ткива и ћелија.....	9

2.3.4.2	Реверзна транскрипција (<i>RT-PCR</i>).....	9
2.3.4.3	Квантитативна ланчана реакција полимеразе (<i>qRT-PCR</i>).....	9
2.3.4.4	Израчунавање релативне генске експресије.....	10
2.3.5	Варијабле које су се мериле у студији.....	12
2.3.6	Снага студије и величина узорка.....	12
2.3.7	Статистичка обрада података.....	13
3	РЕЗУЛТАТИ.....	14
3.1	Описивање узорка.....	14
3.1.1	Подела испитаница.....	14
3.1.2	<i>FIGO</i> стадијум тумора.....	15
3.1.3	Хистолошки градус.....	18
3.1.4	Старост испитаника.....	20
3.1.5	Место боравка.....	21
3.1.6	Тежина испитаника.....	21
3.1.7	Висина испитаника.....	23
3.1.8	Индекс телесне масе.....	24
3.1.9	Крвна група.....	25
3.1.10	Контакт са штетним материјама.....	26
3.1.11	Употреба дуванског дима.....	27
3.1.12	Тип дијете.....	28
3.1.13	Број трудноћа.....	28
3.1.14	Број порођаја.....	29
3.1.15	Контрацепција.....	30
3.1.16	Хроничне болести.....	31
3.1.17	Хроничне болести у групи пацијенткиња са карциномом ендометријума.....	32
3.1.18	Операција.....	32
3.1.19	Породична историја	33
3.2	Дескриптивна статистичка анализа.....	35
3.3	Тестови значајности.....	36

3.3.1	Анализа карактеристика пацијенткиња у односу на дијагнозу.....	36
3.3.2	Провера нормалности расподеле података карактеристика пацијенткиња.....	37
3.4	Анализа <i>Bcl-2</i> , <i>COPB2</i>	41
3.4.1	Провера нормалности расподеле података за експресивност <i>Bcl-2</i> и <i>COPB</i>	41
3.4.2	Поремећај експресије <i>COPB2</i> и <i>Bcl-2</i>	44
3.4.3	Одређивање граничне вредности експресије <i>Bcl-2</i> за појаву карцинома ендометријума.....	45
3.4.4	Одређивање граничне вредности експресије гена <i>COPB2</i> за појаву карцинома ендометријума.....	46
4	ДИСКУСИЈА.....	47
4.1	Опште карактеристике испитаница укључених у студију.....	47
4.2	Досадашња сазнања.....	49
4.3	Добијени резултати релативне експресије <i>COPB2</i> и <i>Bcl-2</i> у ћелијама ендометријума.....	50
5	ЗАКЉУЧАК.....	53
6	ЛИТЕРАТУРА.....	54

1 УВОД

1.1 Карцином ендометријума

1.1.1 Дефиниција

Карцином ендометријума представља малигну болест тела материце који настаје услед претераног раста (хиперплазије) и атипиче ћелија ендометријума. Прогресијом болести долази до инвазије строме, миометријума и васкуларних простора (1).

1.1.2 Инциденца

Инциденца карцинома ендометријума је у порасту, како због продуженог људског века тако и због повећане изложености факторима ризика (гојазност, рана менарха, нулипаритет, касна менопауза) (2). То је најчешћи карцином женских полних органа. У Србији, у 2022-ој години, број жена оболелих од карцинома ендометријума је био 1182 жене (3).

1.1.3 Етиопатогенеза

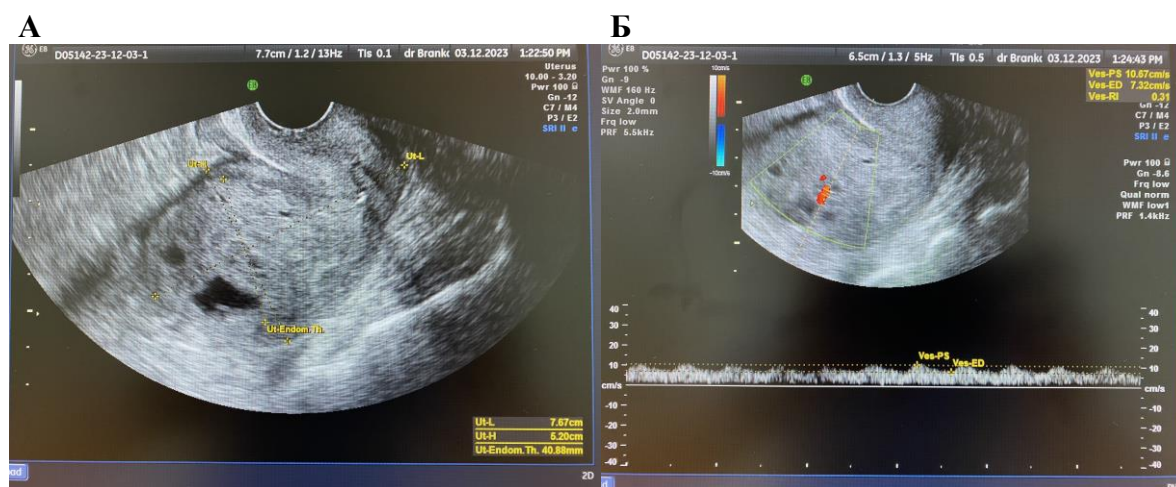
Основна хистолошка подела карцинома ендометријума је на два типа:

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* (2,4).

1.1.4 Дијагноза

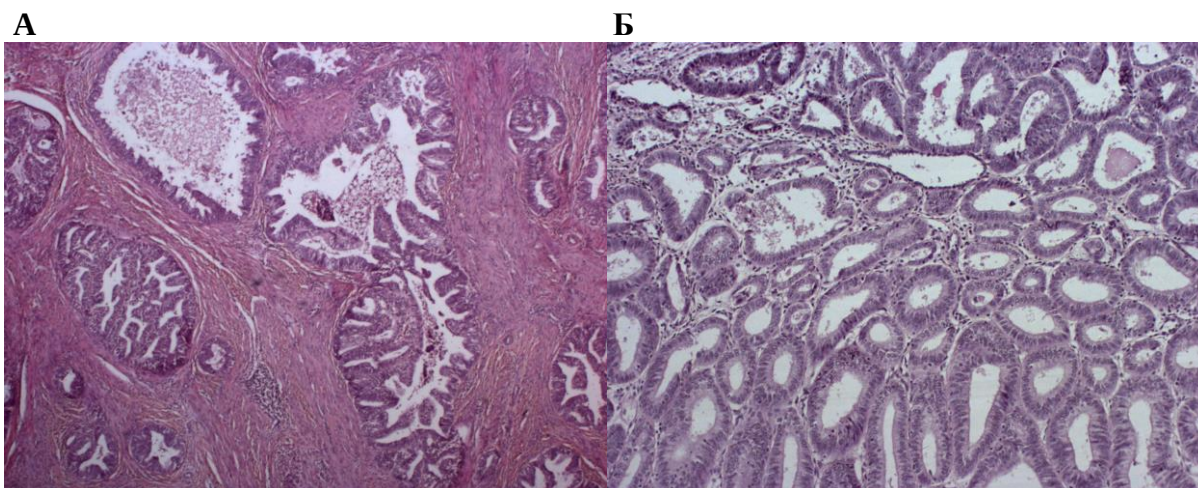
Не постоји ни један ефикасан скрининг тест за рано откривање карцинома ендометријума. *PAPA* тест ће бити нормалан код 50% пацијенткиња са карциномом ендометријума па самим тим и није метода избора (5). У склопу лабораторијског испитивања (туморских маркера), једино *CA125* је употребљив али је и он углавном повишен код агресивнијих типова и нема високу специфичност (6). Поред трансвагиналног ултразвучног прегледа, додатне радиолошке методе које се могу спровести јесу и *MRI* (магнетна резонанца) и *CT* (компјутеризована томографија) мале карлице (7,8,9). Ове радиолошке методе имају користи у процени проширености болести као и разликовања ендометријалног карцинома који је захватио грлић материце од примарно ендоцервикалног карцинома (10).



Слика 1. Трансвагинални ултразвучни приказ карцинома ендометријума (А). Доплерски запис крвних судова карцинома ендометријума (Б).

Трансвагинални ултразвучни преглед има значајну улогу у склопу испитивања пацијенткиња на карцином ендометријума (11). Слика 1(А) приказује карактеристичну слику карцинома ендометријума. Овакав налаз је некада тешко разликовати од хиперплазије. У томе помажу доплерски записи. Слика 1(Б) приказује доплерски запис из централних крвних судова задебљалог ендометријума, код којих ниске вредности индекса отпора ($Ri=0.31$) указују на постојање малигне болести (12).

Крварење из ендометријума представља први и рани симптом болести који води непосредном постављању дијагнозе (13). Због тога се препоручује да се код сваког постменопаузалног крварења као и рецидивирајућих менометрорагија у перименопаузи искључи карцином ендометријума (4). Једини сигуран начин да се потврди или искључи дијагноза карцинома ендометријума јесте ПХ (патохистолошка анализа) ендометријалног ткива (Слика 2) (14). Ткиво за ПХ анализу се може добити експлоративном киретажом, хистероскопијом или *Pipelle* биопсијом (15,16).



Слика 2. Хистолошка слика карцинома ендометријума, микроскопско увећање x25 (А). Хистолошка слика карцинома ендометријума, микроскопско увећање x100 (Б).

1.1.5 Класификација

Поред основне хистолошке поделе на две групе постоји и *FIGO (International federation of Gynecology and Obstetrics)* класификација која представља клиничку поделу и која се користи приликом одабира најадекватнијег третмана лечења пацијента. Заснива се на проширености тумора у утерусу (дубини инвазије у миометријум или проширености тумора на грлић материце) као и евентуалном захватању околних структура или постојању удаљених метастаза. Последња ревизија ове класификације је из 2023. године (17).

Хистолошки градус је важан прогностички параметар и говори нам колико туморске ћелије различито изгледају у односу на нормалне ћелије ендометријума. (18,19). Овај систем градирања се заснива на жлезданој архитектоници и диференцијацији. Са прогресијом диференцијације долази до збијања туморских жлезда које постају ближе постављене формирајући солидна поља са све слабијим распознавањем жлезданих структура, што се назива солидан образац раста (20). Уколико је $\leq 5\%$ то је први градус (Г1); када имамо 6%-50% солидних поља у односу на жлездану компоненту то је други градус (Г2); и најтежи облик када је проценат $>50\%$ што спада у трећи градус (Г3) (21). Овакав начин градирања важи за ендометриоидне аденокарциноме. Такође и степен нуклеарне атипичности може да укаже на виши градус. Када су у питању агресивни типови ендометријалих карцинома (серозни аденокарцином и светлоћелијски аденокарцином-*clear cell*) они увек спадају у трећи градус (Г3). Што је виши хистолошки градус прогноза је лошија (19,22).

Молекуларна класификација карцинома ендометријума представља поделу на основу молекуларно-биолошких карактеристика које независно од *FIGO* стадијума и хистолошког градуса могу утицати на ток и развој болести (23). Овај систем групише карцином ендометријума у четири типа(24):

- 1) Ултрамутирани (*POLE* мутирани) су најчешћи код млађих жена и одликују се добром прогнозом.

- 2) Хипермутирани (*MMR-d*) представљају групу тумора са умереном добром прогнозом, карактерише је микросателитска нестабилност услед дефицијентне поправке неслагања.
- 3) Абнормални *P53* (*P53 abn*) се карактеришу мутацијом гена са великим бројем копија *P53* и ниском стопом мутација. Овај тип тумора карактерише висока стопа морталитета.
- 4) Карцином ендометријума без специфичног молекуларног профила (*non-specific molecular profile-NSMP*). Они представљају групу карцинома код којих није уочена једна од молекуларних промена из претходне три групе. Карактеришу се углавном добрим клиничким исходом.

1.1.6 Терапија

Уобичајени третман пацијенткиња са карциномом ендометријума јесте хируршки. То подразумева хистеректомију са обостраном аднексектомијом и евентуалном пелвичном лимфодектомијом (25). У случају агресивнијих типова или проширености тумора на околне структуре и/или постојање удаљених метастаза након хируршке процедуре може се спровести и адјувантна радиотерапија и/или хемиотерапија. У почетним стадијумима није доказана корист од адјувантне терапије али је у узрапредовалим стадијумима смањивала учесталост рецидива. (26,27). Ретко се може спровести радио и хемиотерапија као примарни третман без претходне хируршке процедуре. Успешност овакве терапије је слабија уколико се претходно не спроведе оперативна процедура али постоје одређене групе пацијенткиња које из појединих разлога не могу бити подвргнуте хируршком захвату (28). Једна од карактеристика појединих типова овог малигнитета јесте и добар одговор на хормонску терапију. Код пацијенткиња у почетним стадијумима болести *FIGO IA1*, које још увек нису завршиле рађање или пацијенткиње код којих је други третман неприхватљив, могуће је користити интраутерусни уложак (*IUDs- Intrauterine devices*) са левоноргестрелом или континуирану примену прогестеронских препарата (29, 30).

1.1.7 Прогноза

Најважнији фактори који утичу на исход лечења карцинома ендометријума су *FIGO* стадијум, хистолошки тип, градус, дубина инвазије миометријума и присуство секундарних депозита (метастаза) у лимфоваскуларним просторима. Прогнозе су лошије у старијој популацији, код пацијенткиња са узрапредовалим стадијумима болести, присуством лимфоваскуларних метастаза и агресивнијег облика тумора (зависи од хистолошког типа (31,32). Самим тим благовремено откривање ове болести код пацијенткиња повећава успешност лечења и стопу преживљавања. У почетним стадијумима болести, код пацијенткиња које немају друге факторе ризика, стопа петогодишњег преживљавања је > 85,7% (33).

1.1.8 Хиперплазија ендометријума

Хиперплазија ендометријума представља бенигно стање слузнице материце и може се поделити на два облика (34). Код хиперплазије без атипичности не постоји атипична једара жлезданих ћелија ендометријума. Уколико постоји атипична једара ендометријалних ћелија ради се о хиперплазији са атипичношћу (35). Овај вид хиперплазије може представљати и претечу карцинома ендометријума и код већине пацијенткиња ће после извесног времена доћи до развоја ендометријалног карцинома (36). Студија *Gynecologic Oncology Group (GOG)* је показала да код 42.6% пацијенткиња са атипичном хиперплазијом већ постоје малигно промењене ћелије ендометријума (37). Хиперплазија сама по себи представља прекомерно умножавање ћелија, стога је патохистолошка верификација засада једина сигурна процедура на основу које се може поставити или искључити дијагноза карцинома ендометријума (38).

1.2 Апоптоза

1.2.1 Малигна трансформација ћелије

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 (39). Инхибиција апоптозе удружена са поремећајем репарационих ДНК (дезоксирибонуклеинска киселина) механизма доводи до убрзаног нагомилавања генетских грешака, поремећаја у транскрипцији и последичног развоја малигнитета (40,41).

1.2.2 Процес апоптозе

Процес програмиране ћелијске смрти, или апоптозе, генерално карактеришу различите морфолошке карактеристике и биохемијски процеси. Апоптоза се сматра важном компонентом различитих процеса укључујући нормалан раст ћелија. Неодговарајућа апоптоза (премало или превише) је фактор многих људских стања укључујући неуродегенеративне болести, исхемијска оштећења, аутоимуне поремећаје и многе врсте малигнитета. Способност модулације живота или смрти ћелије препозната је због њеног огромног терапеутског потенцијала (42). 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). Поједини ванћелијски и унутарћелијски сигнали могу индуковати процесе апоптозе. Резултати експерименталних истраживања су показали да је процес апоптозе регулисан великим бројем унутарћелијских модулатора од којих су протеини фамилије *Bcl-2* једни од најважнијих. (43,44,45,46).

1.2.3 Bcl-2

Протеини фамилије *Bcl-2* главни су унутарћелијски модулатори апоптозе (47). Већина ових протеина имају про-апоптотски ефекат, док 6 чланова ове фамилије има анти-апоптотски ефекат (48). Ген за протеин *Bcl-2* (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) је локализован на дугом краку хромозома 18. Током истраживања на узорцима периферне крви болесника оболелих од *non-Hodgkin* фоликуларног лимфома показало се да се хромозомском транслокацијом t(14;18) активира прото-онкоген *Bcl-2*. Овом транслокацијом, ген *Bcl-2* пребацује се у близину локуса тешког ланца имуноглобулина, што доводи до високог нивоа његове експресије (49). *Bcl-2* је унутарћелијски протеин тежине 26 kDa, локализован у мембранама митохондрија, ендомплазматског ретикулума и у спољашњој мембрани једра (50). Протеин *Bcl-2* важан је унутарћелијски регулатор процеса апоптозе у којој учествује као њен инхибитор, односно има анти-апоптотски ефекат. (51). Његова улога у настанку и прогресији карцинома ендометријума још увек није довољно истражена. У бројним истраживањима добијени су опречни резултати обзиром на његову улогу у процесу апоптозе. Поједине студије су показале нижи ниво генске експресије код карцинома ендометријума у односу на хиперплазију ендометријума (52,53).

1.2.4 COPB2

COPB2 (*Coatamer protein complex subunit $\beta 2$*) чини 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 (54,55). Протеин *COPB2* је кодиран геном на хромозому 3q23 (56). Смањена активност *COPB2* у ћелијама доводи до заустављања ћелијског циклуса у G0/G1 или S фази ћелијске деобе и смањује ћелијски раст и пролиферацију (57). Студије које су се бавиле испитивањем улоге *COPB2* у процесу развоја малигнитета указују да би могао имати значајну улогу у развоју и напредовању карцинома утичући на инхибицију процеса апоптозе и повећане ћелијске пролиферације код туморогенезе. Истраживања која су то потврдила рађена су испитивањем карцинома различитих органа: карцинома колона, карцинома плућа, карцинома простате, холангиоцелуларног карцинома као и карцинома желуца (57,56,58,59,60). Исти резултати су нађени и код карцинома дојке (61).

2 ЦИЉЕВИ И МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА

2.1 Циљ студије

Циљ ове студије је анализирати поремећај регулације апоптозе преко експресије гена за протеин *Bcl-2*, експресије гена за *COPB2*, као и да се утврди њихова повезаност са процесом настанка карцинома ендометријума.

2.2 Хипотезе студије

1. Поремећај експресије гена за *COPB2* у ћелијама ендометријалног ткива значајан је фактор који доводи до настанка карцинома ендометријума.
2. Поремећај експресије гена за протеин *Bcl-2* удружена са поремећајем експресије *COPB2* повећава ризик за настанак карцинома ендометријума.
3. Предвидети граничну вредност експресије гена за *COPB2* у ћелијама ендометријалног ткива која доводи до настанка карцинома ендометријума.

2.3 Материјал и методе рада

2.3.1 Врста студије

Истраживање је обављено по типу проспективне контролисане клиничке експерименталне студије спроведене на две групе пацијенткиња. Истраживачи су се у потпуности придржавали препорука Хелсиншке декларације, Светске медицинске асоцијације (www.wma.org), принципа добре клиничке праксе, Међународне конференције за хармонизацију (www.ich.org) током истраживања које је одобрио надлежни Етички одбор Клиничког Центра Крагујевац дана 15.04.2019. године, заведено у писарници под бројем 01/19-1592 дана 17.04.2019.

2.3.2 Популација која се истражује

У студију су биле укључене пацијенткиње које су лечене на Гинеколошко - акушерској Клиници КЦ „Крагујевац“ и које су испуњавале укључујуће критеријуме и нису имале искључујуће критеријуме. Експерименталну групу је чинило 40 пацијенткиња код којих је претходно потврђен карцином ендометријума експлоративном киретажом или оперативном процедуром-тотална хистеректомија са обостраном аднексектомијом. Након завршеног оперативног лечења на одељењу патологије узимао се део малигно измењеног ткива и похрањивао у течни азот. Ткиво пре тога није потапано у формалин. Код пацијенткиња које су чиниле експерименталну групу нисмо узимали у обзир дубину инвазије карцинома, као ни постојање метастатских промена. Контролну групу су чиниле пацијенткиње код којих смо након експлоративне киретаже хистопатолошки искључили премалигне и малигне промене ендометријума. Узорци који су узимани за контролну групу чували су се до пристизања хистопатолошких резултата, а за анализу су се користили само они који су испуњавали укључујуће критеријуме.

2.3.3 Узорковање

Укључујући критеријуми за учествовање у студији били су:

1. Потписан добровљни пристанак за учествовање у студији.
2. Дијагностикован карцином ендометријума хистопатолошким анализом након експлоративне киретаже код пацијенткиња у експерименталној групи. Ендометријално ткиво се узимало након оперативне процедуре (тоталне хистеректомије са обостраном аднексектомијом).
3. Све пацијенткиње код којих је била урађена експлоративна киретажа, а којима се патохистолошким анализом искључило постојање карцинома ендометријума или атипична хиперплазија чиниле су контролну групу уколико није било искључујућих критеријума.

Искључујући критеријуми:

1. Пацијенткиње које су у тренутку узимања материјала за испитивање имале још једну или више дијагностикованих малигних болести, а чије лечење још увек није завршено.
2. Пацијенткиње које су користиле 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.
5. Пацијенткиње које се лечене од психијатријских болести и које нису биле у могућности да дају валидну сагласност.

2.3.4 Генетска обрада материјала

Генетска обрада материјала је спроведена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. По одмрзавању из ткива методом реверзне транскрипције квантитативног *PCR-a* (*reverse transcription-quantitative PCR / RT-qPCR*) оређивала се експресивност гена за *COPB2* и протеин *Bcl-2* у ћелијама ендометријалног ткива.

2.3.4.1 Изолација РНК (рибонуклеинске киселине) из ткива и ћелија

Из узорака (ендометријално ткиво) изоловала се рибонуклеинска киселина по принципу за изолацију РНК који се заснива на фенол/хлороформ реакцији коју су први описали Chomczynski и Sacchi (1987). За изолацију РНК користили смо *RNA Extracol* (*EURx, Gdansk, Poland*) по упутствима произвођача. Концентрацију сваког узорка измерена је на биофотометру *Eppendorf BioPhotometer Plus* (*Eppendorf, Hamburg, Germany*). Однос апсорбанци 260 и 280 nm који је између 1.8-2.0 представљао је показатељ чисте РНК без присуства других компоненти. На основу добијене концентрације, РНК узорци су чувани на -80 °C до започињања анализа (62).

2.3.4.2 Реверзна транскрипција (*RT-PCR*)

Потом се радила 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*) (63). Коришћен је: *First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*) према упутствима произвођача и 1 µl изоловане РНК концентрације 1 µg/µl. Коришћен је апарат: *Eppendorf mastercycler gradient PCR*. Добијени узорци комплементарне ДНК чувани су на -80 °C.

2.3.4.3 Квантитативна ланчана реакција полимеразе (*qRT-PCR*)

За анализу генске експресије употребљен је *AMPLIFYME SG Universal Mix Kit* (*Blirt, Gdansk, Poland*) који је коришћен према упутствима произвођача да се направи реакциона смеша. Да би добили реакциону смешу додато је пар прајмера и боје (*Rox Low*). Реакциона смеша је прављена за сваки ген појединачно. За анализу генске експресије користила се комплементарна ДНК као полазни молекул (64). *PCR* плоче са 1 µl комплементарне ДНК и реакционом смешом постављене су у апарат *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems apparatus* према упутствима произвођача. Добијени резултати су анализирани помоћу *Applied Biosystems 7500 software 2.3* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*). Релативна квантификација генске експресије *COPB2* и *Bcl-2* добијена је у односу на експресију *GAPDH* („housekeeping gene“) у истом узорку као контрола (65).

Прајмери за гене *GAPDH*, *COPB2*, *Bcl-2*:

Прајмер	Секвенца прајмера (<i>Forward</i>)	Секвенца прајмера (<i>Reverse</i>)
<i>GAPDH</i>	5'-AAGCAGGAGTATGACGAGTCCG-3'	5'-GCCTTCATACATCTCAAGTTGG-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'

Табела 1. Секвенце прајмера

2.3.4.4 Израчунавање релативне генске експресије

За израчунавање релативне генске експресије из ткива користила се следећа формула:

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

ΔC_{T1} = C_T вредност испитиваног гена у узорку.

ΔC_{T2} = C_T вредност *GAPDH* („housekeeping gene“) у узорку.

За израчунавање релативне генске експресије користила се следећа формула:

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

ΔC_{T1} = разлика C_T вредности испитиваног гена и C_T вредности *GAPDH* у експерименталној групи.

ΔC_{T2} = разлика C_T вредности испитиваног гена и C_T вредности *GAPDH* у контролним групама.

Добијене вредности релативне генске експресије у експерименталној и контролној групи за гене *Bcl-2* и *COPB2* за сваку пацијенткињу посебно са одговарајућом дијагнозом:

дијагноза	<i>Bcl-2</i>	<i>COPB2</i>
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.001724029	0.011678510
<i>Adenocarcinoma_endometrii, Serous</i>	0.001748096	0.005226280
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.015788304	0.013602353
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.002129898	0.022328033
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.002733566	0.011965297
<i>Adenocarcinoma endometrii, Serous</i>	0.009226505	0.000004584
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.004809158	0.011719055
<i>Adenocarcinoma_endometrii</i>	0.003412394	0.003619485
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.001270842	0.002622212
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.001352646	0.008032139
<i>Adenocarcinoma_endometrii</i>	0.001724029	0.006546774
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.014278616	0.016401823
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.004440691	0.008088007
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.021344379	0.018325546
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.028164077	0.014731008
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.016064279	0.009322935
<i>Adenocarcinoma_endometrii</i>	0.018010724	0.000028375
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.004143311	0.004030012
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.011517728	0.000005139
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.001129578	0.003695538
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.003307599	0.026737345
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.007572577	0.061853541
<i>Adenocarcinoma endometrii, Serous</i>	0.005048253	0.015898120
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.012516717	0.074068298
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.000847206	0.043284671
<i>Clear cell carcinoma endometrii</i>	0.001297545	0.018325546
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.033609200	0.007016659
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.025382887	0.043134917
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.079936599	0.003284752
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.006801176	0.013744517
<i>Adenocarcinoma endometri</i>	0.014578640	0.011398596
<i>Adenocarcinoma endometrii, Serous</i>	0.010561803	0.013322420
<i>Adenocarcinoma endometri</i>	0.013840117	0.014477938
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.013230396	0.006524124
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.127626516	0.132127255
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.031034140	0.004759415
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.007238969	0.001414983
<i>Adenocarcinoma endometri</i>	0.012006837	0.001973538
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.014731008	0.038473263
<i>Adenocarcinoma endometrii</i>	0.003657313	0.006412044
<i>Hyperplasio endometrii</i>	0.050066867	0.010237448

<i>Hyperplasio endometrii</i>	0.004825854	0.015463385
<i>Adenomiosis, Hyperplasio endometrii</i>	0.194791145	0.050942021
<i>Hyperplasio endometrii</i>	0.031906629	0.034315400
<i>Hyperplasio endometrii</i>	0.153893052	0.046714039
<i>Leyomyoma uteri, Hyperplasio endometrii</i>	0.036778336	0.041665584
<i>Endometriosis ovarii, Hyperplasio endometrii</i>	0.406126198	0.101884042
<i>Myoma uteri, Hyperplasio endometrii</i>	0.053846635	0.059954007
<i>Hyperplasio endometrii</i>	0.061001985	0.086269835
<i>Leyomyoma uteri, Hyperplasio endometrii</i>	0.004487103	0.089622203
<i>Hyperplasio endometrii, Leyomioma uteri</i>	0.013230396	0.064257114
<i>Myoma uteru, Hyperplasio endometrii</i>	0.016401823	0.076150641
<i>Leyomioma uteri, Hyperplasio endometrii</i>	0.011319861	0.047861187
<i>Hyperplasio endometrii</i>	0.004186615	0.029462017
<i>Hyperplasio endometrii</i>	0.020333466	0.104024842
<i>Leyomioma uteri, Hyperplasio endometrii</i>	0.006944083	0.198884121
<i>Polypus endometrii, Hyperplasio endometrii</i>	0.002346945	0.062068281
<i>Hyperplasio endometrii</i>	0.002064488	0.102237757
<i>Hyperplasio endometrii</i>	0.002658817	0.072543995
<i>Leyomioma uteri, Hyperplasio endometrii</i>	0.011359160	0.007839623

Табела 2. Вредности релативне генске експресије *Bcl-2* и *COPB2*

2.3.5 Варијабле које су се мериле у студији

Независне варијабле: релативна експресивност гена за *COPB2*, релативна експресивност 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).

2.3.6 Снага студије и величина узорка

За одређивање величине узорка коришћен је софтвер G*Power 3.0.10.

Главни циљ ове студије је да анализира повезаност експресије гена за *COPB2* у ћелијама ендометријалног ткива са настанком карцинома ендометријума, код експерименталне групе коју чине пацијенткиње са карциномом 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, користи се т тест независних узорака. Усвојено је да је величина експерименталне

групе дупло већа од величине контролне групе. За примену двостраног т 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 (узета је препоручена вредност јер не постоје радови у којима се анализира експресија гена *COPB2* на појаву карцинома ендометријума); добијено је да је укупан број пацијенткиња 58, односно 39 пацијенткиња у експерименталној групи и 19 пацијенткиња у контролној групи (57).

Усвојена је величина узорка од 60 пацијенткиња, односно 40 пацијенткиња у експерименталној групи и 20 пацијенткиња у контролној групи.

2.3.7 Статистичка обрада података

Статистичка обрада података урађена је у програму *IBM SPSS Statistics* верзија 21.

Подаци су прво приказани дескриптивно коришћењем табела и графика. Непрекидне променљиве су приказане коришћењем најмање и највеће вредности, као и просечне вредности и стандардног одступања а графички коришћењем хистограма. Категоријске променљиве су приказане коришћењем апсолутне и релативне учесталости а графички коришћењем кружног и стубичастог графика.

Анализа нормалности расподеле података урађена је помоћу Шапиро-Вилковог теста, с обзиром да је у групи пацијенткиња са карциномом ендометријума било 40 њих а у контролној групи 20, што је у оба случаја мање од педесет.

За анализу социо-демографских и осталих карактеристика пацијенткиња у односу на дијагнозу, за случај да су променљиве биле непрекидне коришћен је Студентов т тест за независне узорка уколико су подаци пратили нормалну расподелу, односно Ман-Витнијев У тест уколико подаци нису пратили нормалну расподелу а статистички значајни резултати су графички приказани коришћењем стубичастог односно правоугаоног графика. За случај да имају категоријске променљиве, коришћен је хи-квадрат тест за независност а статистички значајни резултати су приказани коришћењем стубичастог кластер графика.

За анализу експресије гена, с обзиром на то да подаци нису пратили нормалну расподелу, коришћен је Ман-Витнијев У тест, а статистички значајни резултати су приказани коришћењем правоугаоног графика.

За одређивање критичних вредности експресије гена за појаву карцинома ендометријума цртана је РОЦ крива и на основу сензитивности и специфичности одређена критична вредност.

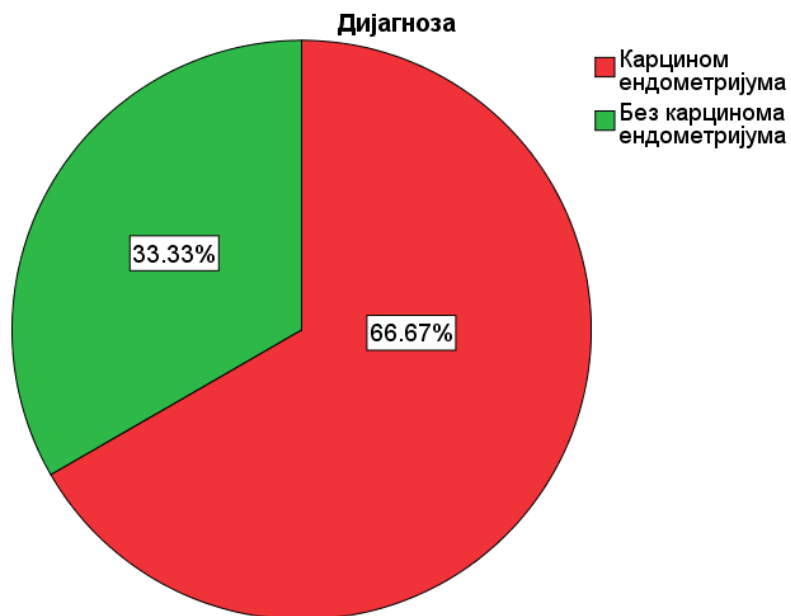
Резултати су сматрани статистички значајним уколико је значајност (p вредност) била мања или једнака 0,05.

3 РЕЗУЛТАТИ

3.1 Описивање узорка

3.1.1 Подела испитаница

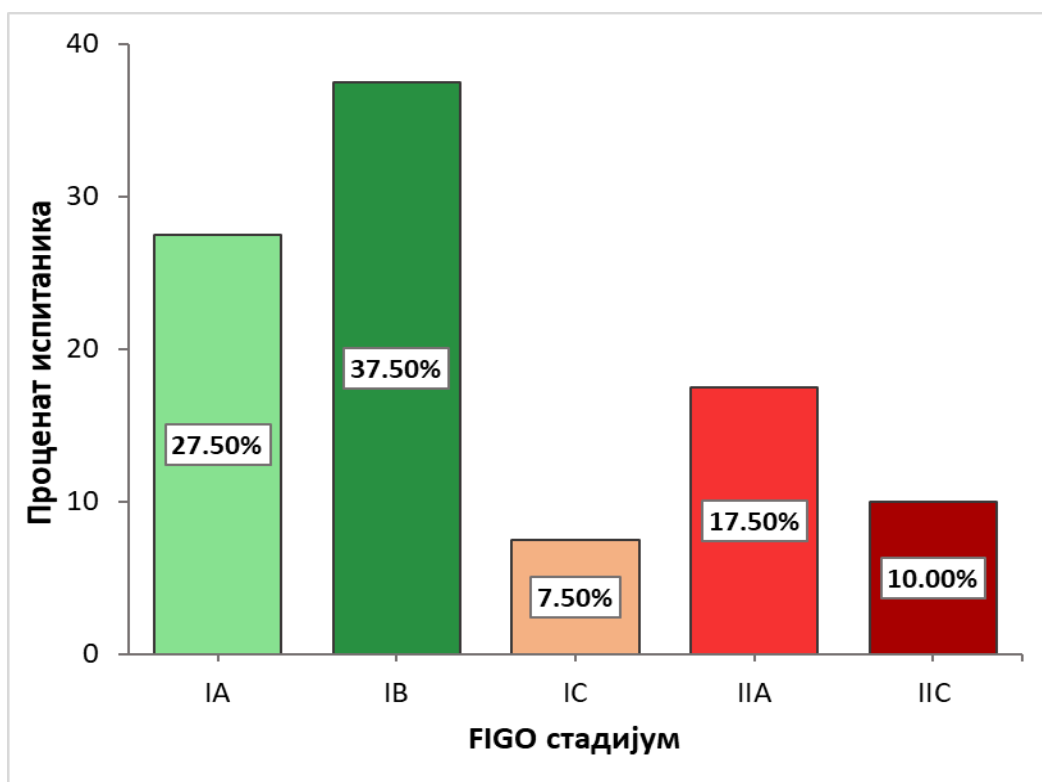
Узорак је чинило 60 пацијенткиња од који су њих 40 биле са карциномом ендометријума, а 20 у контролној групи без карцином ендометријума.



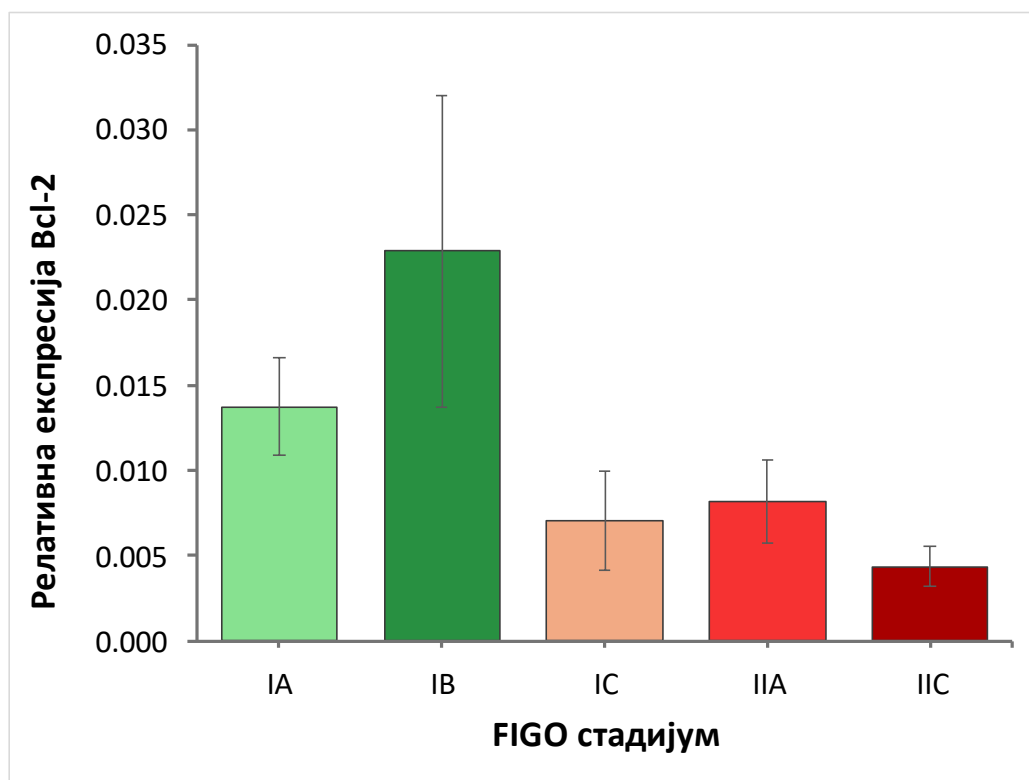
Графикон 1. Однос контролне и експерименталне групе.

3.1.2 FIGO стадијум тумора

Подела по *FIGO* стадијуму извршена је према последњој ревизији класификације 2023. У овој студији све пацијенткиње су биле у раним стадијумима болести, без захватања околних структура нити присуства удаљених метастаза. Сходно томе, највише пацијенткиња је било у првом Б стадијуму (37,50%).

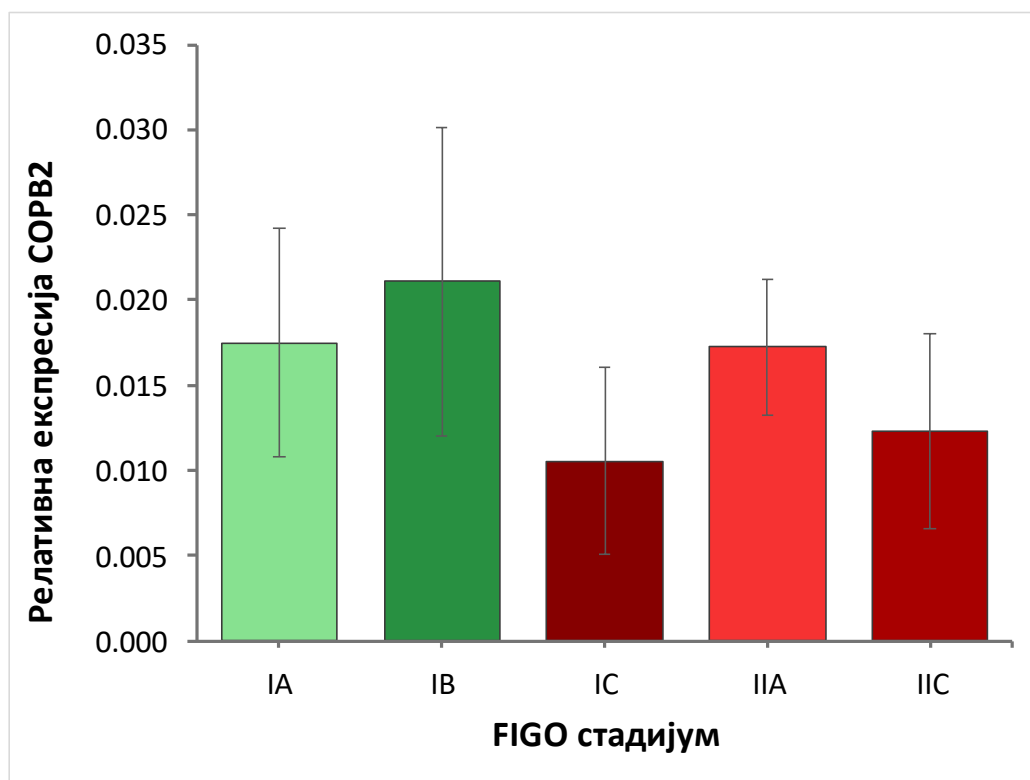


Графикон 2. *FIGO* класификација



Графикон 3. Релативна експресија *Bcl-2*

У првој Б групи пацијенткиња је вредност релативне експресије *Bcl-2* била највиша у односу на остале стадијуме.

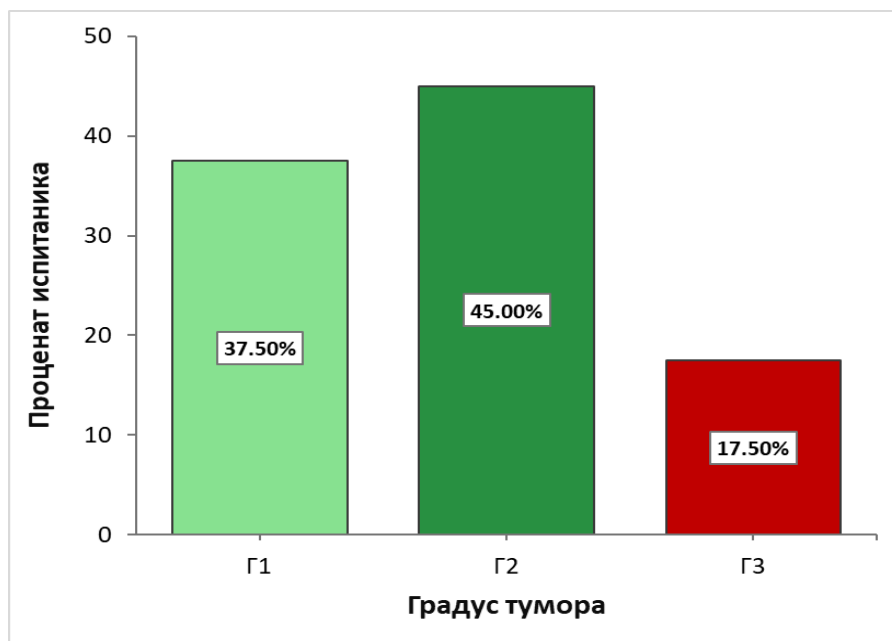


Графикон 4. Релативна експресија *COPB2*

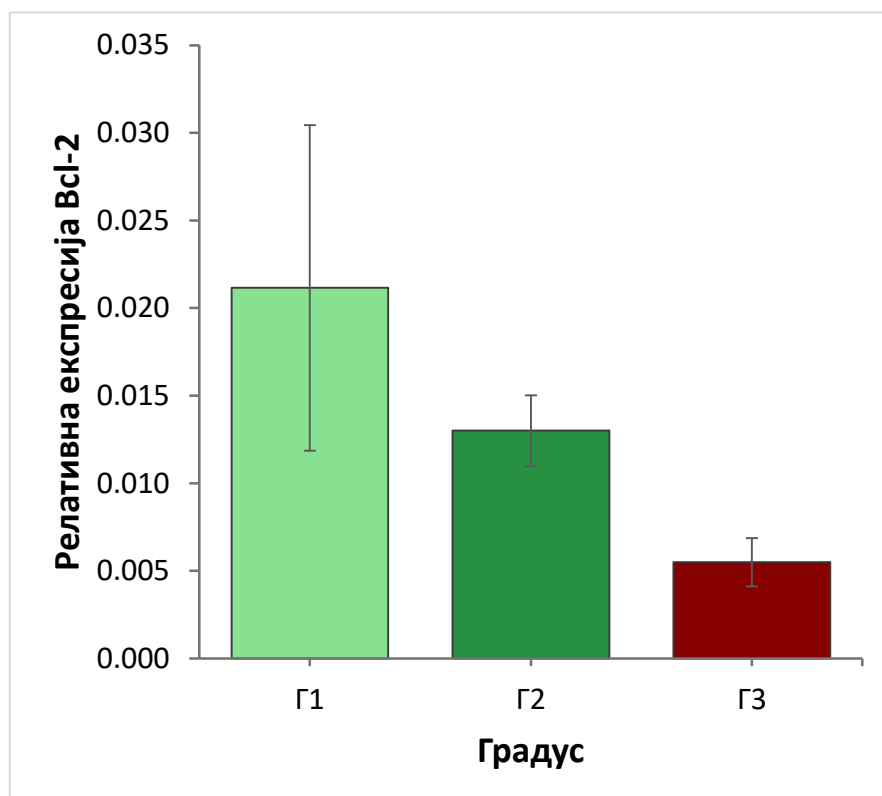
У првој Б групи пацијенткиња вредност релативне експресије *COPB2* је била највиша у односу на остале стадијуме.

3.1.3 Хистолошки градус

У односу на хистолошки градус тумора највише пацијенткиња је са Г2 (другим градусом) 45%.

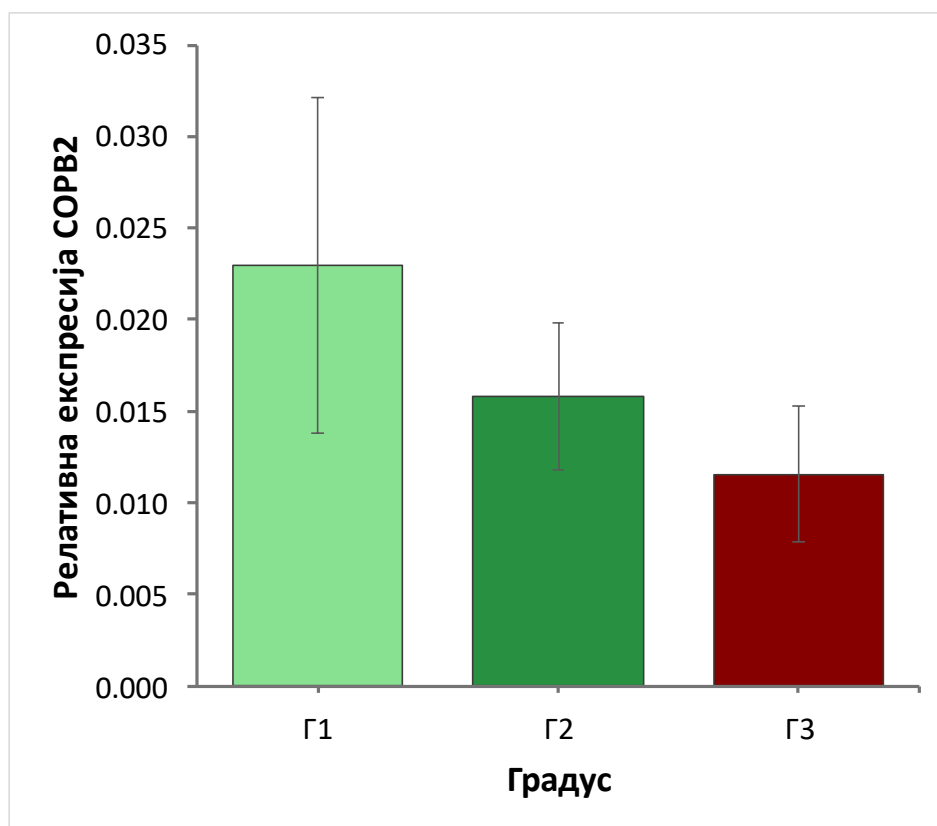


Графикон 5. Хистолошки градус тумора



Графикон 6. Вредност релативне експресије *Bcl-2*

Вредност релативне експресије *Bcl-2* била је највиша у првом градусу (Г1) односу на остале градусе.



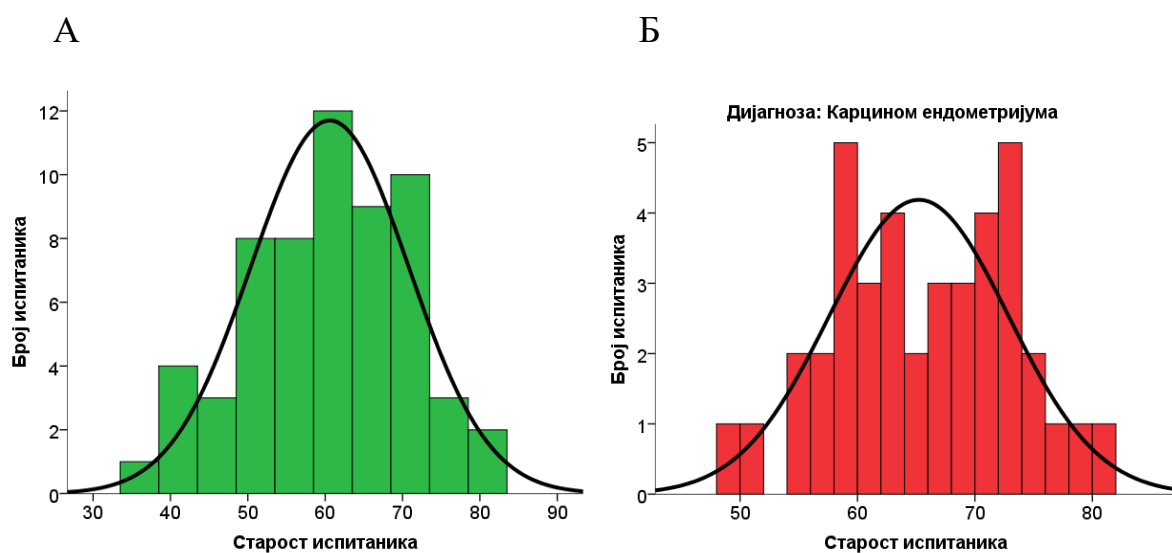
Графикон 7. Вредност релативне експресије *COPB2*

Вредност релативне експресије *COPB2* била је највиша у првом градусу (Г1) односу на остале градусе.

3.1.4 Старост испитаника

СТАРОСТ	Најмања вредност	Највећа вредност	Просечна вредност	Стандардно одступање
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	49	80	65,23	7,62
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	36	68	51,30	8,34
Све пацијенткиње	36	80	60,58	10,23

Табела 3. Старост испитаника



Пацијенткиње су имале од 36 до 80 година при чему је просечна старост испитаника износила $60,58 \pm 10,23$ година, док су пацијенткиње са карциномом ендометријума у просеку старије и њихова просечна старост износи $65,23 \pm 7,62$ године.

3.1.5 Место боравка

МЕСТО БОРАВКА	Град		Село	
	Број	Проценат	Број	Проценат
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	25	62,5%	15	37,5%
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	15	75,0%	5	25,0%
Све пацијенткиње	40	66,7%	20	33,3%

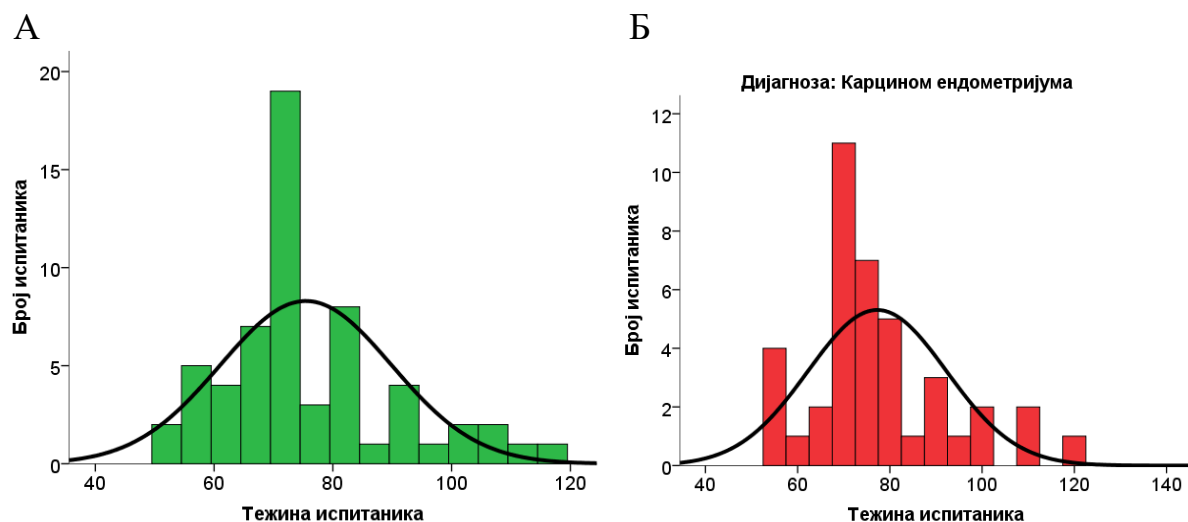
Табела 4. Место боравка

Две трећине пацијенткиња је из урбаних средина, док проценат оних са карциномом ендометријума износи 62,5%.

3.1.6 Тежина испитаника

ТЕЖИНА	Најмања вредност	Највећа вредност	Просечна вредност	Стандардно одступање
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	55	118	77,25	15,03
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	52	105	71,85	12,71
Све пацијенткиње	52	118	75,45	14,42

Табела 5. Тежина испитаника



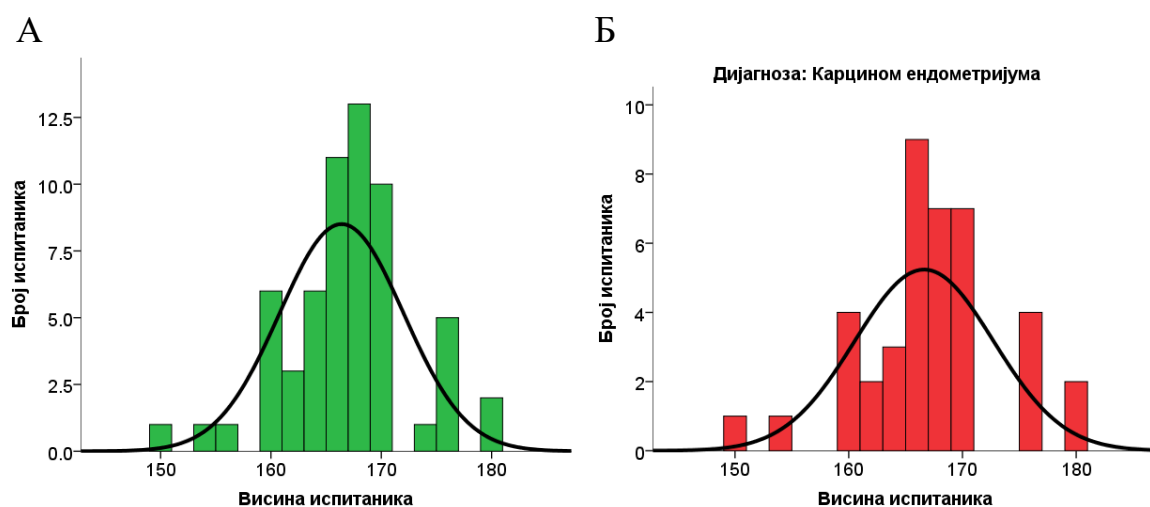
Графикон 9. Тежина испитаника (А) Контролна група, (Б) Експериментална група

Пацијенткиње су имале од 52 до 118 килограма при чему је просечна тежина износила $75,45 \pm 14,42$ килограма, док је код пацијенткиња са карциномом ендометријума та вредност већа и износи $77,25 \pm 15,03$ килограма.

3.1.7 Висина испитаника

ВИСИНА	Најмања вредност	Највећа вредност	Просечна вредност	Стандардно одступање
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	150	180	166,63	6,09
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	155	175	165,95	4,67
Све пацијенткиње	150	180	166,40	5,63

Табела 6. Висина испитаника



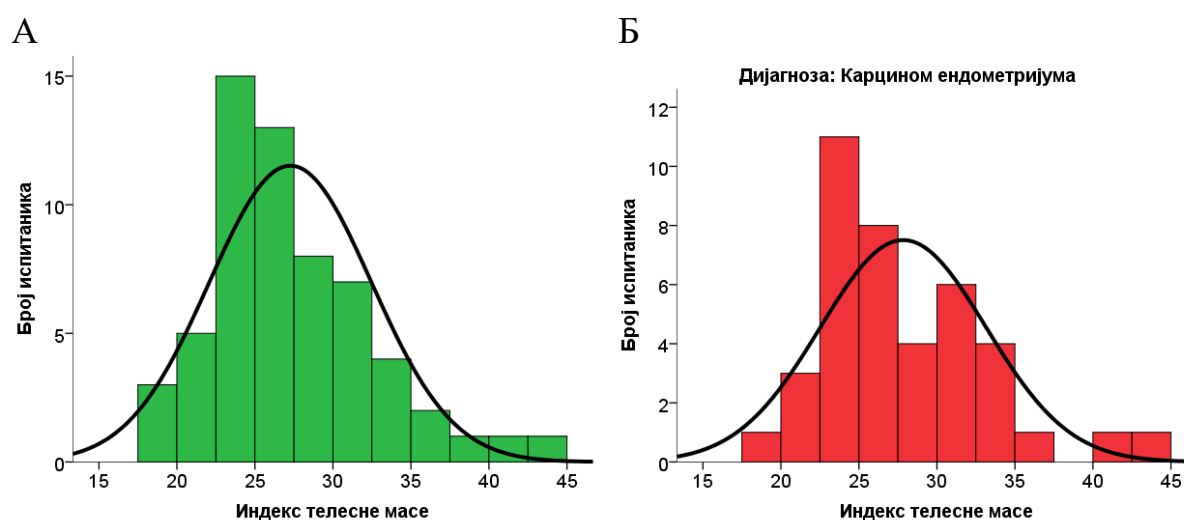
Графикон 10. Висина испитаника (А) Контролна група, (Б) Експериментална група

Пацијенткиње су биле високе од 150 до 180 центиметара при чему је просечна висина износила $166,40 \pm 5,63$ центиметара, док је код пацијенткиња са карциномом ендометријума та вредност незнатно већа и износи $166,63 \pm 6,09$ центиметара.

3.1.8 Индекс телесне масе

ИНДЕКС ТЕЛЕСНЕ МАСЕ	Најмања вредност	Највећа вредност	Просечна вредност	Стандардно одступање
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	19,61	42,82	27,84	5,31
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	19,57	39,13	26,14	4,88
Све пацијенткиње	19,57	42,82	27,27	5,19

Табела 7. Индекс телесне масе



Графикон 11. Индекс телесне масе (BMI) (А) Контролна група, (Б) Експериментална група

Индекс телесне масе се кретао у границама од 19,57 до 42,82 при чему је просечна вредност БМИ износила $27,27 \pm 5,19$, док је код пацијенткиња са карциномом ендометријума та вредност незнатно већа и износи $27,84 \pm 5,31$.

3.1.9 Крвна група

КРВНА ГРУПА	А		Остале	
	Број	Проценат	Број	Проценат
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	21	52,5%	19	47,5%
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	10	50,0%	10	50,0%
Све пацијенткиње	31	51,7%	29	48,3%

Табела 8. Крвна група

РХ ФАКТОР	Позитиван		Негативан	
	Број	Проценат	Број	Проценат
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	36	90,0%	4	10,0%
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	18	90,0%	2	10,0%
Све пацијенткиње	54	90,0%	6	10,0%

Табела 9. РХ фактор

Више од половине пацијенткиња је А+ крвна група, док 90% пацијенткиња је са позитивним Рх фактором и у целом узорку и код пацијенткиња са карциномом ендометријума.

3.1.10 Контакт са штетним материјама

КОНТАКТ СА ШТЕТНИМ М.	Да		Не	
	Број	Проценат	Број	Проценат
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	2	5,0%	38	95,0%
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	2	10,0%	18	90,0%
Све пацијенткиње	4	6,7%	56	93,3%

Табела 10. Контакт са штетним материјама

А



Б



Графикон 12. Контакт са штетним материјама (А) Контролна група, (Б) Експериментална група

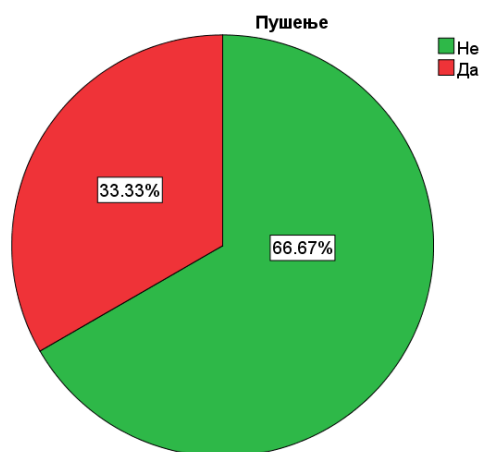
Свега 6,7% пацијенткиња је имало контакт са штетним материјама, док је код пацијенткиња са карциномом ендометријума тај проценат и мањи и износи 5%.

3.1.11 Употреба дуванског дима

УПОТРЕБА ДУВАНСКОГ ДИМА	Да		Не	
	Број	Проценат	Број	Проценат
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	15	37,5%	25	62,5%
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	5	25,0%	15	75,0%
Све пацијенткиње	20	33,3%	40	66,7%

Табела 11. Употреба дуванског дима

А



Б



Графикон 13. Употреба дуванског дима (А) Контролна група, (Б) Експериментална група

Једна трећина испитаника користи цигарете, док је код пацијенткиња са карциномом ендометријума тај проценат већи и износи 37,5%.

3.1.12 Тип дијете

Тип дијете				
	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid Стандардна	60	100.0	100.0	100.0

Табела 12. Исхрана

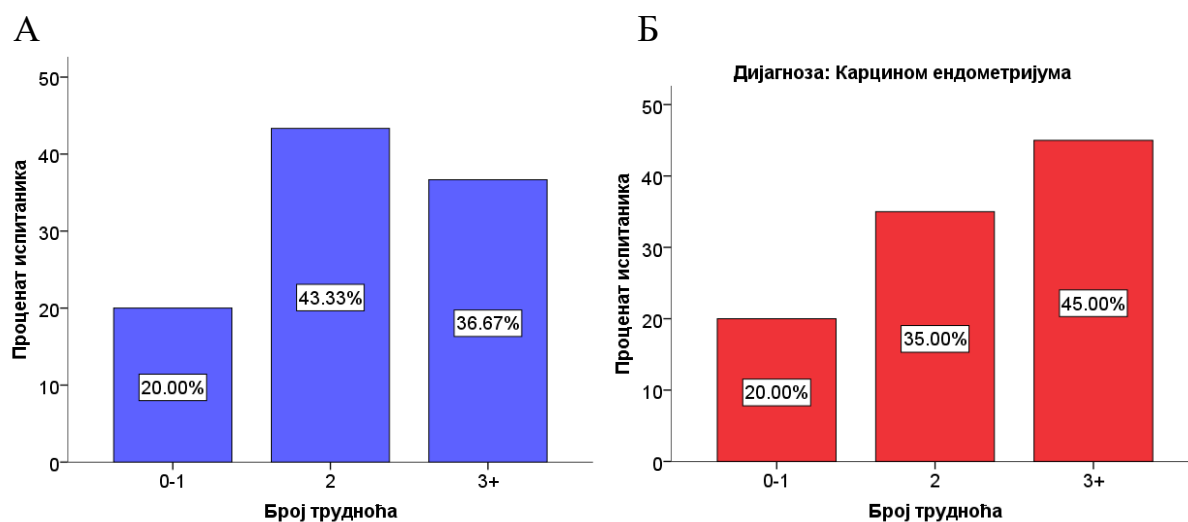
Сви испитаници из обе групе су били на стандардној дијети.

3.1.13 Број трудноћа

БРОЈ ТРУДНОЋА	0-1		2		3+	
	N	%	N	%	N	%
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	8	20,0%	14	35,0%	18	45,0%
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	4	20,0%	12	60,0%	4	20,0%
Све пацијенткиње	12	20,0%	26	43,3%	22	36,7%

Табела 13. Број трудноћа

Пацијенткиње су имале од 0 до 10 трудноћа, при чему је у контролној групи највећи проценат пацијенткиња са две трудноће, док је у експерименталној групи највећи проценат пацијенткиња са три и више трудноћа.



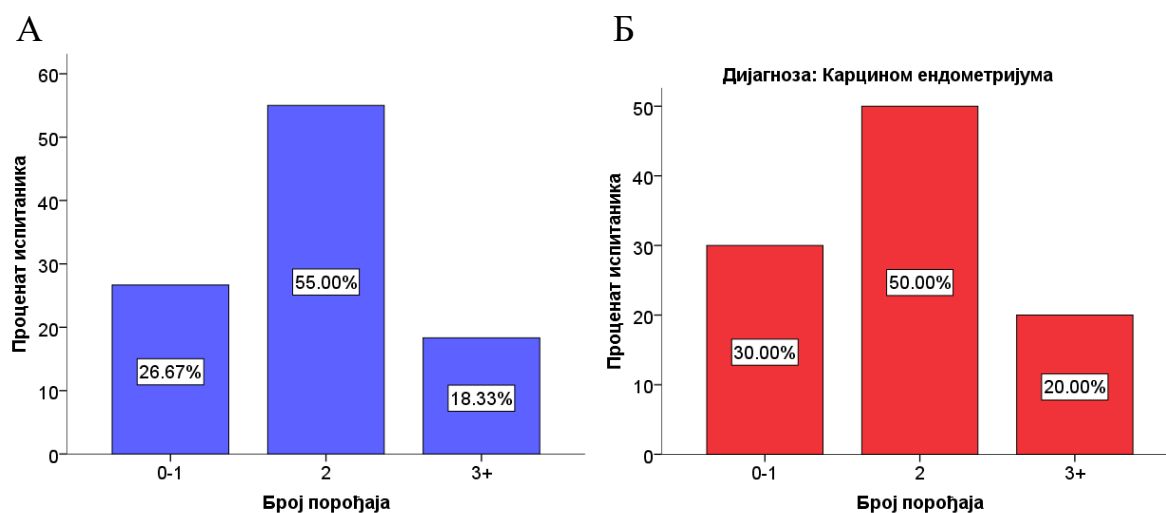
Графикон 14. Број трудноћа (А) Контролна група, (Б) Експериментална група

3.1.14 Број порођаја

И број трудноћа и број порођаја је боље посматрати као категоријску променљиву него заиста као број, јер се одговори крећу у доста уском интервалу.

БРОЈ ПОРОЂАЈА	0-1		2		3+	
	N	%	N	%	N	%
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	12	30,0%	20	50,0%	8	20,0%
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	4	20,0%	13	65,0%	3	15,0%
Све пацијенткиње	16	26,67%	33	55,0%	11	18,33%

Табела 14. Број порођаја



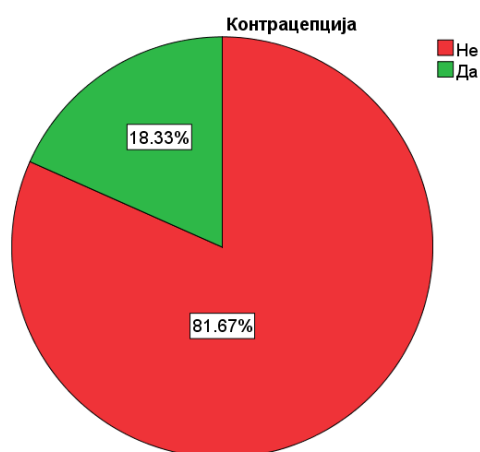
Графикон 15. Број порођаја (А) Контролна група, (Б) Експериментална група

3.1.15 Контрацепција

КОНТРАЦЕПЦИЈА	Да		Не	
	Број	Проценат	Број	Проценат
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	6	15,0%	34	85,0%
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	5	25,0%	15	75,0%
Све пацијенткиње	11	18,3%	49	81,7%

Табела 15. Контрацепција

А



Б



Графикон 16. Контрацепција (А) Контролна група, (Б) Експериментална група

У целом узорку 18,3% пацијенткиња је користило неки вид контрацепције док код оних са карциномом ендометријума тај проценат је и мањи и износи 15%.

3.1.16 Хроничне болести

ХРОНИЧНЕ БОЛЕСТИ	Да		Не	
	Број	Проценат	Број	Проценат
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	37	92,5%	3	7,5%
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	13	65,0%	7	35,0%
Све пацијенткиње	50	83,3%	10	16,7%

Табела 16. Хроничне болести

А



Б



Графикон 17. Хроничне болести (А) Контролна група, (Б) Експериментална група

У целом узорку 83,3% пацијенткиња има хроничне болести док у групи оних са карциномом ендометријума тај проценат је 92,5%.

3.1.17 Хроничне болести у групи пацијенткиња са карциномом ендометријума

ХРОНИЧНЕ БОЛЕСТИ	Има		Нема	
	Број	Проценат	Број	Проценат
Хипертензија	30	75,0%	10	25,0%
Дијабетес мелитус	8	20,0%	32	80,0%
Кардиоваскуларне болести	5	12,5%	35	87,5%
Депресија	4	10,0%	36	90,0%
Хипертиреоза	3	7,5%	37	92,5%

Табела 17. Хроничне болести

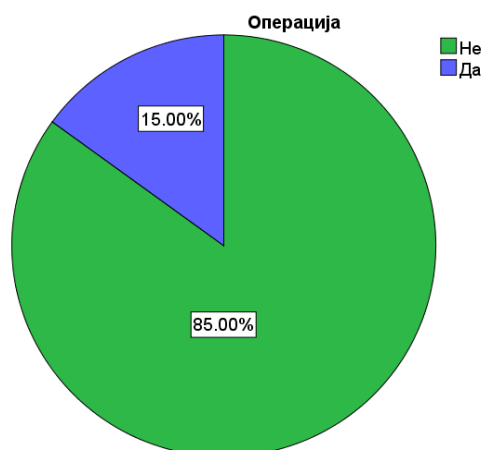
Од хроничних болести најчесталија је хипертензија коју има 75% пацијенткиња у групи оних са карциномом ендометријума. На другом месту је дијабетес мелитус са 20%.

3.1.18 Операција

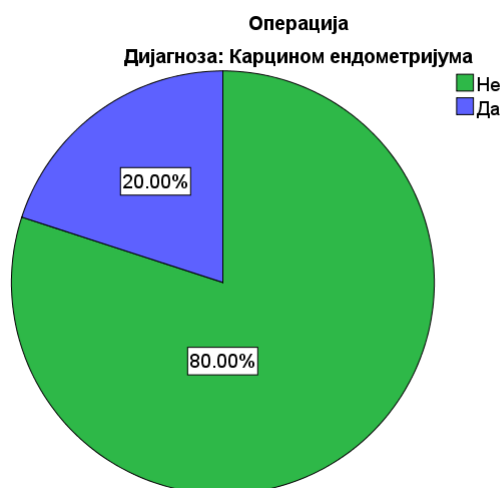
ОПЕРАЦИЈА	Да		Не	
	Број	Проценат	Број	Проценат
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	8	20,0%	32	80,0%
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	1	5,0%	19	95,0%
Све пацијенткиње	9	15,0%	51	85,0%

Табела 18. Оперативне процедуре

А



Б



Графикон 18. Оперативне процедуре (А) Контролна група, (Б) Експериментална група

У целом узорку 15% пацијенткиња је имало неку операцију у прошлости, док у групи пацијенткиња са карциномом ендометријума је то 20%.

3.1.19 Породична историја

ПОРОДИЧНА ИСТОРИЈА	Позитивна		Негативна	
	Број	Проценат	Број	Проценат
Пацијенткиње са карциномом ендометријума	2	5,0%	38	95,0%
Пацијенткиње без карцинома ендометријума	1	5,0%	19	95,0%
Све пацијенткиње	3	5,0%	57	95,0%

Табела 19. Породична историја

А



Б



Графикон 19. Породична историја (А) Контролна група, (Б) Експериментална група

Свега 5% пацијенткиња има позитивну породичну историју и у целом узорку и само у групи пацијенткиња са карциномом ендометријума.

3.2 Дескриптивна статистичка анализа

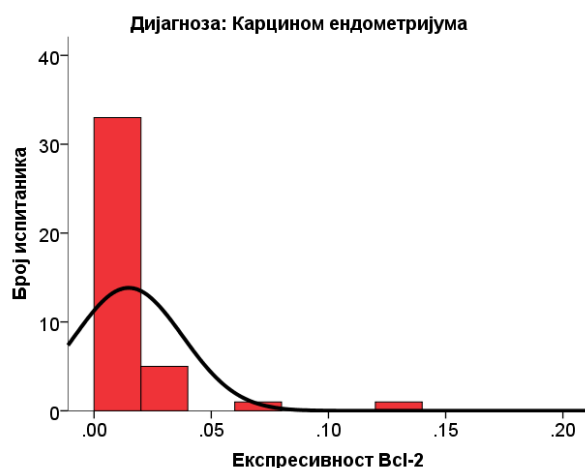
У оквиру дескриптивне статистичке анализе одредићемо најмању и највећу вредност, као и просечну вредност и стандардно одступање за променљиве које се односе на експресије гена *Bcl-2* и *COPB2* (Табела 20).

	Пацијенткиње са карциномом ендометријума		Пацијенткиње без карцинома ендометријума	
	$X_{\text{MIN}}-X_{\text{MAX}}$	$M\pm SD$	$X_{\text{MIN}}-X_{\text{MAX}}$	$M\pm SD$
Експресивност <i>Bcl-2</i>	0,001-0,128	0,015 $\pm$ 0,023	0,002-0,406	0,054 $\pm$ 0,097
Експресивност <i>COPB2</i>	0,000-0,132	0,018 $\pm$ 0,025	0,008-0,199	0,065 $\pm$ 0,043

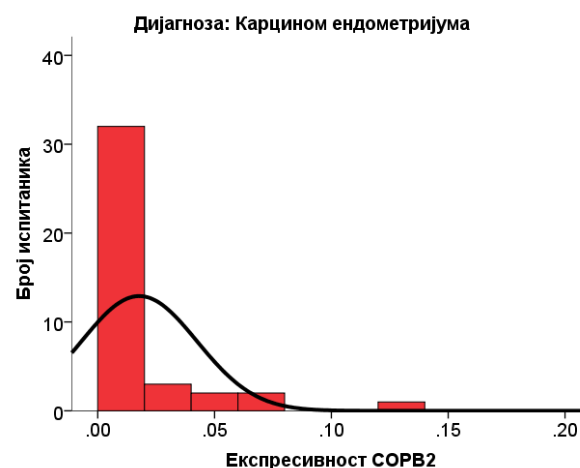
Табела 20. Експресивност *Bcl-2* и *COPB2*

Графички приказ расподеле вредности за експресију гена код пацијенткиња са карциномом ендометријума приказаћемо помоћу хистограма (Графикон 20 и 21).

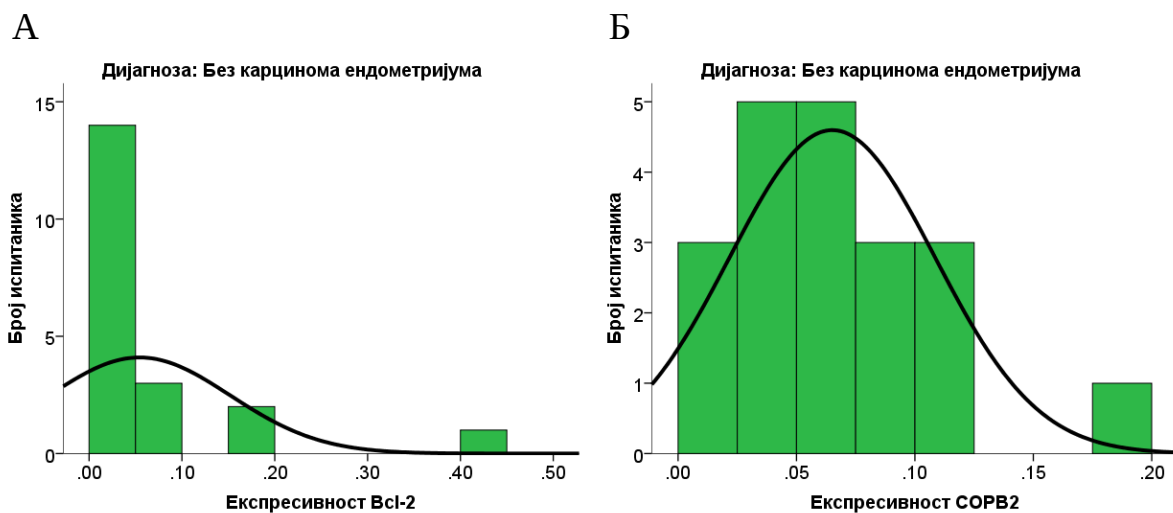
А



Б



Графикон 20. Експресивност гена у експерименталној групи (А) *Bcl-2*, (Б) *COPB2*



Графикон 21. Експресивност гена у контролној групи (А) *Bcl-2*, (Б) *COPB2*

3.3. Тестови значајности

3.3.1 Анализа карактеристика пацијенткиња у односу на дијагнозу

За анализу карактеристика пацијенткиња у односу на њихову дијагнозу, у зависности од врсте података, применићемо хи-квадрат тест за независност уколико анализирамо категоријске променљиве, а т тест за независне узорке односно Ман-Витнијев тест уколико анализирамо непрекидне променљиве.

3.3.2 Провера нормалности расподеле података карактеристика пацијенткиња

За проверу нормалности расподеле података користимо Шапиро-Вилк тест нормалности.

	Пацијенткиње са карциномом ендометријума			Пацијенткиње без карцинома ендометријума		
	Статистика	Број степени слободе	Значајност	Статистика	Број степени слободе	Значајност
Старост испитаника	0,987	40	0,601	0,952	20	0,400
Тежина испитаника	0,927	40	0,013	0,934	20	0,184
Висина испитаника	0,961	40	0,181	0,973	20	0,812
Индекс телесне масе	0,933	40	0,019	0,922	20	0,106

Табела 21. Резултати-Шапиро-Вилков тест

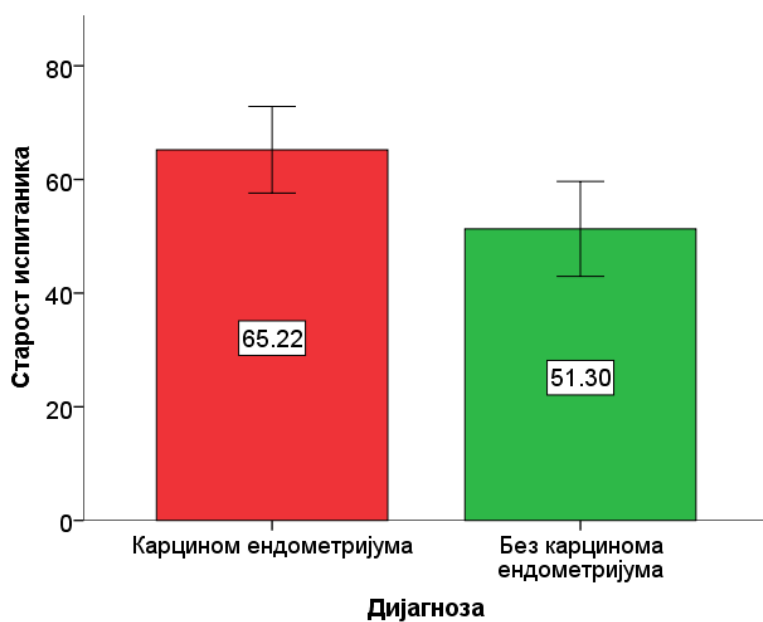
На основу резултата Шапиро-Вилковог теста видимо да подаци за тежину испитаника и индекс телесне масе код пацијенткиња са карциномом ендометријума не прате нормалну расподелу, тако да ћемо за ове две променљиве применити Ман-Витнијев тест, а за старост и висину испитаника ћемо применити Студентов т тест за независне узорке (Табела 21).

	Статистика теста	Број степени слободе	Значајност
Старост испитаника	t=6,466	58	0,000
Место боравка	Chi=0,938	1	0,333
Тежина испитаника	Z=1,272		0,203
Висина испитаника	t=0,435	58	0,665
Индекс телесне масе	Z=1,231		0,218
БМИ (мање и веће од 30)	Chi=2,088	1	0,148
Крвна група	Chi=10,116	7	0,182
Крвна група (A+ - остале)	Chi=0,033	1	0,855
Резус фактор	Chi=0,000	1	1,000
Контакт са штетним материјама	Chi=0,536	1	0,464
Пушење	Chi=0,938	1	0,333
Тип дијете	-	-	-
Број трудноћа	Chi=4,196	2	0,123
Број порођаја	Chi=1,227	2	0,541
Контрацепција	Chi=0,891	1	0,345
Хроничне болести	Chi=7,260	1	0,007
Хипертензија	Chi=9,025	1	0,003
Дијабетес мелитус	Chi=0,960	1	0,327
Кардиоваскуларне болести	Chi=0,081	1	0,776
Хипертиреоза	Chi=0,134	1	0,714
Депресија	Chi=2,143	1	0,143
Операција	Chi=2,353	1	0,125
Породична историја	Chi=0,000	1	1,000

Табела 22. Резултати статистичке обраде варијабли

Утврдили смо да постоји статистички значајна разлика просечне старости пацијенткиња са и без карцинома ендометријума, као и значајна повезаност између постојања хроничних болести и хипертензије и дијагнозе карцинома ендометријума (Табела 22).

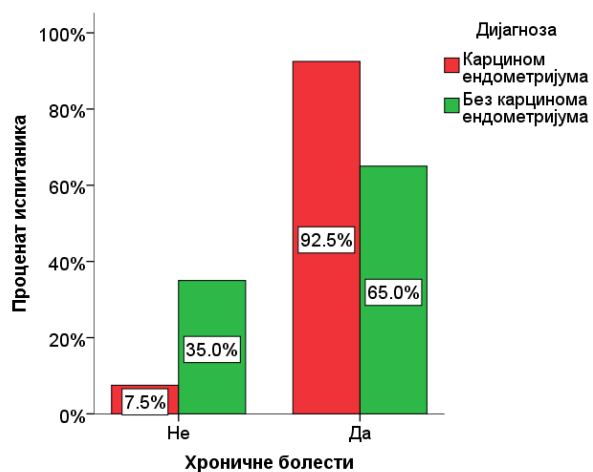
На следећим Графиконима приказаћемо поменуте значајне разлике и повезаности.



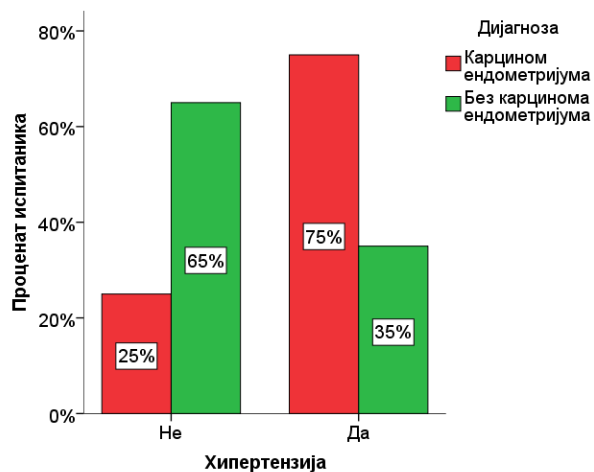
Графикон 22. Старост испитаника

Са Графикона 22 се уочава да су пацијенткиње са карциномом ендометријума (M=65,22 године) значајно старије у односу на оне без карцинома (M=51,30 година).

А



Б



Графикон 23. (А) Хроничне болести, (Б) Хипертензија

Са Графикона 23 се уочава и да је значајно већи проценат пацијенткиња које имају карцином ендометријума, а да имају и хроничне болести, као и хипертензију као једну од хроничних болести.

3.4 Анализа *Bcl-2*, *COPB2*

3.4.1 Провера нормалности расподеле података експресивност *Bcl-2* и *COPB2*

	Пацијенткиње са карциномом ендометријума			Пацијенткиње без карцинома ендометријума		
	Статистика	Број степени слободе	Значајност	Статистика	Број степени слободе	Значајност
Експресивност <i>Bcl-2</i>	0,551	40	0,000	0,579	20	0,000
Експресивност <i>COPB2</i>	0,633	40	0,000	0,891	20	0,028

Табела 23. Провера нормалности расподеле података

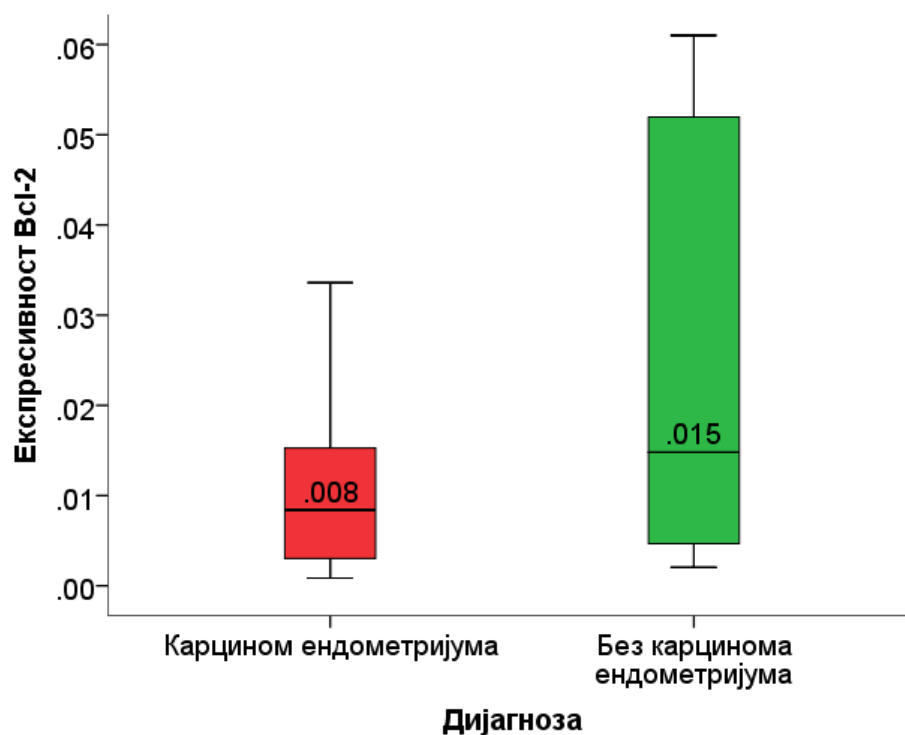
На основу резултата анализе нормалности расподеле података за анализу свих ових променљивих користи се Ман-Витнијев У тест (Табела 23).

	Z статистика	Број степени слободе	Значајност
Експресивност <i>Bcl-2</i>	2,078		0,038
Експресивност <i>COPB2</i>	4,736		0,000

Табела 24. Резултати-Ман-Витнијев тест

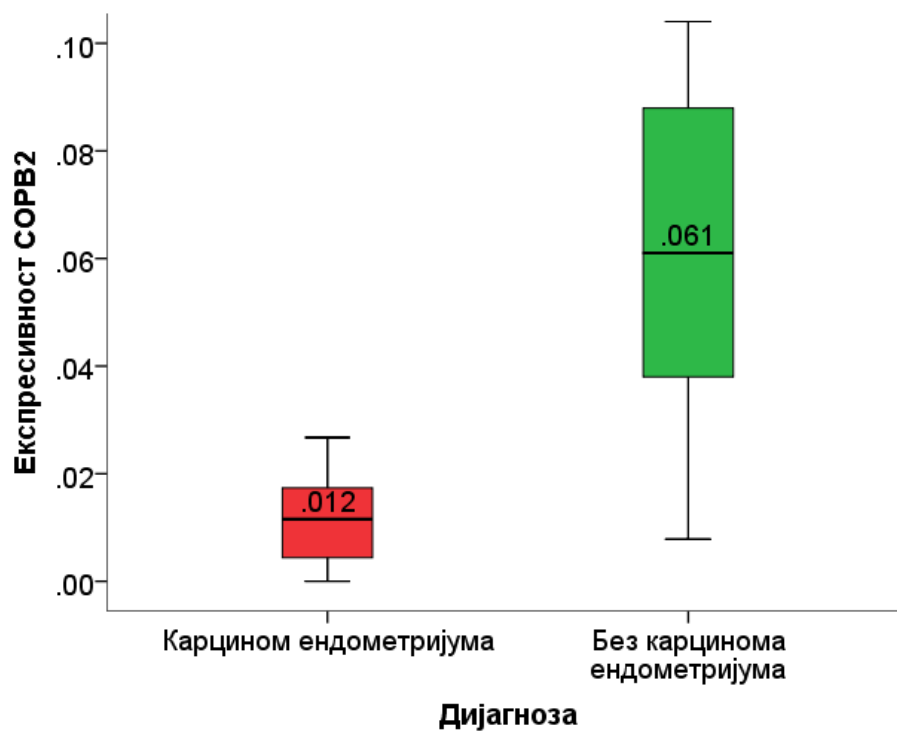
Применом Ман-Витнијевог У теста утврдили смо да постоји статистички значајна разлика у вредностима експресије гена *COPB2* и *Bcl-2* између пацијенткиња са карциномом ендометријума и без карцинома (Табела 24).

За графички приказ користимо правоугаони графикон.



Графикон 24. Експресивност гена *Bcl-2*

Са Графикона 24 се уочава да су значајно мање вредности експресивности *Bcl-2* код пацијенткиња са карциномом ендометријума ($M=0,008$) у односу на оне без карцинома ($M=0,015$).



Графикон 25. Експресивност гена *COPB2*

Са Графикона 25 се уочава да су значајно мање вредности експресије гена *COPB2* код пацијенткиња са карциномом ендометријума ($M=0,012$) у односу на оне без карцинома ($M=0,061$).

3.4.2 Поремећај експресије *COPB2* и *Bcl-2*

	Z статистика	Број степени слободе	Значајност
<i>COPB2</i>	3,003		0,003
Експресивност <i>COPB2</i>	4,736		0,000

Табела 25. Експресија *COPB2*

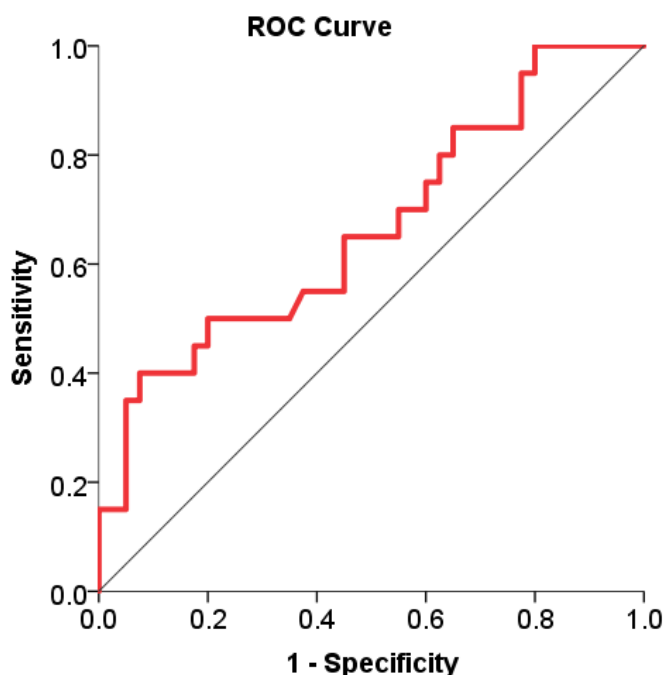
Применом Ман-Витнијевог У теста утврдили смо да постоји статистички значајна разлика ($P < 0,005$) у вредностима експресије гена *COPB2* између пацијенткиња са карциномом ендометријума и без карцинома ендометријума. Графички приказ овог резултата дат је на Графикону 25.

	Z статистика	Број степени слободе	Значајност
<i>Bcl-2</i>	2,439		0,015
Експресивност <i>Bcl-2</i>	2,078		0,038

Табела 26. Експресија *Bcl-2*

Применом Ман-Витнијевог У теста утврдили смо да постоји статистички значајна разлика у вредностима експресије гена *Bcl-2* између пацијенткиња са карциномом ендометријума и без карцинома. Графички приказ овог резултата приказан је на Графикону 24.

3.4.3 Одређивање граничне вредности експресије *Bcl-2* за појаву карцинома ендометријума



Графикон 26. РОЦ крива за *Bcl-2* ($AUC = 0.666$, $p = 0.038$, сензитивност (*sensitivity*) = 77.5%, специфичност (*specificity*) = 50.0%)

Area Under the Curve				
Test Result Variable(s): Експресивност <i>Bcl-2</i>				
Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.666	.076	.038	.516	.815

Табела 27. Површина испод криве (AUC) *Bcl-2*.

Површина испод криве износи 0,666 и овај резултат је статистички значајан ($p=0,038$).

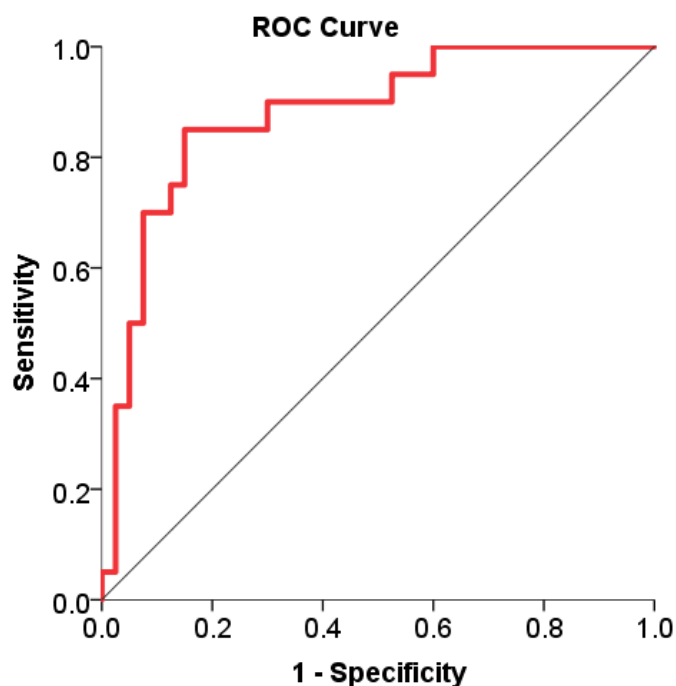
Одређивање граничне вредности:

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Сензитивност	1-Специфичност	Специфичност	Сензитивност *Специфичност
.0159250	.500	.225	0.775	0.388
.0162300	.500	.200	0.800	0.400
.0172050	.450	.200	0.800	0.360

Табела 28. Граничне вредност *Bcl-2*

Преломну вредност одређујемо за максималну вредност производа сензитивности и специфичности и она износи 0,016.

3.4.4 Одређивање граничне вредности експресије гена *COPB2* за појаву карцинома ендометријума



Графикон 27. РОЦ крива за *COPB2* ($AUC = 0.878$, $p < 0.001$, сензитивност (*sensitivity*) = 85.0%, специфичност (*specificity*) = 85.0%.)

Area Under the Curve				
Test Result Variable(s): Експресивност <i>COPB2</i>				
Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.877	.048	.000	.784	.971

Табела 29. Површина испод криве (AUC) *COPB2*

Површина испод криве износи 0,877 и овај резултат је статистички значајан ($p=0,000$).

Одређивање граничне вредности:

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Сензитивност	1-Специфичност	Специфичност	Сензитивност *Специфичност
.0245350	.850	.175	0.825	0.701
.0281000	.850	.150	0.850	0.723
.0318900	.800	.150	0.850	0.680

Табела 30. Гранична вредност *COPB2*

Преломну вредност одређујемо за максималну вредност производа сензитивности и специфичности и она износи 0,028.

4 ДИСКУСИЈА

4.1 Опште карактеристике испитаница укључених у студију

У овој експерименталној клиничкој студији за цитогенетичку анализу коришћене су ћелије ендометријалног ткива добијене након неопходне оперативне процедуре како би се испитала повезаност поремећаја регулације апоптозе преко експресије гена за протеин *Bcl-2* и експресије гена за *COPB2* у настанку и развоју карцинома ендометријума.

Пацијенткиње које су ушле у студију подељене су у две групе: контролна група, у којој је било 20 пацијенткиња и експериментална група која је бројала 40 пацијенткиња које су боловале од карцинома ендометријума (Графикон 1). У контролној групи све испитанице су као основну дијагнозу имале хиперплазију ендометријума којој су код појединих пацијенткиња била придружена и друга гинеколошка обољења. Пацијенткиње из експерименталне групе су у највећем броју, њих 35 имале ендометриоидни аденокарцином, 4 су имале серозни тип аденокарцинома и само једна *Clear cell* карцином ендометријума (Табела 2).

Током студије праћен је већи број варијабли на основу којих су груписане пацијенткиње ради упоређивања са другим студијама.

Гледано према старосној структури пацијенткиње које су чиниле експерименталну групу биле су у просеку старије у односу на контролну групу. Посечна старост пацијенткиња експерименталне групе била је 65.23, а контролне групе 51.30 (Табела 3). Најстарија пацијенткиња у експерименталној групи имала је 80, а најмлађа 49 година. На графику 8 се види расподела пацијената по годинама старости у укупном броју и у експерименталној групи. Јасно се закључује да су пацијенткиње са карциномом ендометријума старије у односу на контролну групу што се поклапа са већином студија обзиром да је ово болест која се најчешће јавља код жена у менопаузи и старијој животној доби (66). Ова студија је такође потврдила да постоји статистички значајна разлика просечне старости пацијенткиња између експерименталне и контролне групе (Табела 22, Графикон 22).

Већина пацијенткиња је била из урбаних средина (град) око 2/3 њих у односу на оне које су из руралних средина (село) (Табела 4).

У односу на телесну масу; просечна телесна тежина пацијенткиња експерименталне групе је била 77.25, а пацијенткиња из контролне групе 71.85. (Табела 5, Графикон 9). Просечна висина пацијенткиња експерименталне групе је била 166.63, док су пацијенткиње контролне групе имале просечну висину 165.95 (Табела 6, Графикон 10). Гледано према индексу телесне тежине просечан *BMI* експерименталне групе је био 27.84, док је у контролној групи износио 26.14 (Табела 7, Графикон 11). Пацијенткиње из експерименталне групе су имале нешто већи *BMI* у односу на контролну групу. По критеријумима СЗО (Светске Здравствене Организације), *BMI* преко 25 представља повишену телесну масу што представља резултат који је у складу са до сада познатим чињеницама о гојазности као фактору ризика за настанак карцинома ендометријума (67, 68).

Највећи број пацијенткиња имао је А+ (позитивну) крвну групу, што према укупном броју испитаница није могао бити релевантан податак за даљу анализу (Табела 8 и 9).

Контакт са штетним материјама је имало 10% пацијенткиња контролне групе и 5% пацијенткиња експерименталне групе (Табела 10 и Графикон 12). Пошто се радило о 2 пацијенткиње из сваке групе, због малог броја испитаница није било могуће даље анализирати ове податке. Када је реч о употреби дуванског дима, већи је проценат код пацијенткиња код којих је потврђен карцином ендометријума, експериментална група=37,5%; код 25% испитаница из контролне групе забележена је употреба дуванског дима (Табела 11 и Графикон 13). У претходно рађеним студијама о утицају дуванског дима на развој карцинома ендометријума дошло се до закључка да је ризик за појаву карцинома ендометријума нижи код актуелних и бивших пушача (69,70). Резултати ове студије су другачији обзиром на већи проценат пушача у експерименталној групи. Свакако треба имати у виду и да пушење генерално представља фактор ризика за настанак малигних болести (71). Све испитанице из обе групе су биле на стандардној дијети (Табела 12), према томе начин исхране није могао бити разматран као битан фактор у овој студији.

У контролној групи највећи проценат пацијенткиња је са две трудноће, док је у експерименталној групи највећи проценат пацијенткиња са три и више трудноћа (Табела 13, Графикон 14). Број порођаја је исти у обе групе, односно највећи број пацијенткиња је имало два порођаја (Табела 14, График 15).

Пацијенткиње контролне групе су у већој мери користиле хормонска контрацептивна средства (25%) у односу на испитанице експерименталне групе код којих је тај проценат био мањи (15%) (Табела 15, Графикон 16). Хормонска контрацепција је у досадашњим истраживањима потврђена као један од фактора који могу утицати на смањивање ризика за настанак карцинома ендометријума (72).

Испитанице са карциномом ендометријума су већином имале неку од хроничних болести, 92,5%; проценат испитаница из контролне групе које су имале хроничне болести био је 65%. (Табела 16, Графикон 17). Обзиром да је и просек година виши у групи пацијенткиња оболелих од карцинома ендометријума очекивано је било и да је проценат коморбидитета виши. Најчешћа болест у овој групи била је ХТА (артеријска хипертензија), а потом ДМ (дијабетес мелитус) (Табела 17). Велики број ранијих студија је указао на везу између стања хипергликемије у организму и настанку бројних малигних болести као и карцинома ендометријума (73,74,75). И у овом истраживању утврђена је значајна повезаност између постојања хроничних болести и хипертензије и дијагнозе карцинома ендометријума (Табела 22, Графикон 23). Проценат пацијенткиња које су раније имале оперативне процедуре у експерименталној групи је био 20%, а у контролној групи 5% (Табела 18, Графикон 18).

Позитивна породична анамнеза у обе групе је потврђена код 5% испитаница (Табела 19, Графикон 19). Позитивна породична анамнеза код мањег броја пацијенткиња (око 5%) може имати улогу у настанку карцинома ендометријума, првенствено код породица са *Lynch* синдромом, што је потврђено и другим студијама. (76). У овој студији и обзиром на број испитаница овакав податак се није могао сматрати релевантним за даљу анализу.

4.2 Досадашња сазнања

Малигна трансформација ћелије је процес који се одликује прекомерним (хиперплазијом) и неправилним (анаплазијом) растом ћелија. У основи ових промена долази до поремећаја у метаболичким процесима који се одвијају на нивоу ћелије (40,41). Правовремено откривање ових промена које доводе до настанка малигнитета значајно би повећало успешност лечења, а могуће и довело до нових метода лечења.

Бројни фактори могу довести до карцинома ендометријума. Више студија је покушало да утврди утицај одређених молекуларних промена у зависности од фенотипа пацијента (индекс телесне масе (*BMI*), старост), што се показало као важан фактор (77). Промене на нивоу унутарћелијских механизма регулације раста и диференцијације ћелија јасно утичу на процес малигнитета.

Да поремећаји у ћелијском метаболизму, нарочито на молекуларном нивоу који су задужени за диференцијацију и раст ћелије имају веома важну улогу у малигним процесима показале су и студије које су довеле до употребе молекуларне класификације у процени агресивности карцинома ендометријума (78,79). Молекуларне анализе које су обављене укључујући имунохистохемију за *P53*, *mismatch repair (MMR)*, секвенцирање ДНК за *POLE* егзонуклазе, класификују туморе као *POLE*-мутиране (*POLE*), *MMR*-дефицијентне (*MMR-d*), абнормалне *P53 (P53abn)* и карцином ендометријума без специфичног молекуларног профила, *non-specific molecular profile (NSMP)*. Самим тим дошло је до увођења новог алгорита где су молекуларне анализе могле да промене класификацију ризика ендометријалног карцинома код појединих пацијената. (80).

Овакав нови поглед који се разликује од уобичајене клиничке класификације ендометријума усмеравао је да се испитају и друге молекуларне основе у настанку и развоју карцинома ендометријума. Унутарћелијски механизми задужени за контролу ћелијског циклуса су бројни, али се последњих година све више истраживања фокусира на *COPB2* протеинску субјединицу. Као што је речено, овај протеин учествује у правилном функционисању процеса апоптозе и код поремећаја у експресији овог протеина долази до неконтролисаног раста ћелија. Најновија истраживања упућују да је поремећај његове експресије у основи настанка малигнитета различитих ткива (81). У раду који је обављен *in vitro* на анималном моделу, испитиван је значај смањене експресије *COPB2* на заустављање раста ћелија и даљег развој малигне болести. Утврђена је веза између високе експресије *COPB2* и развоја карцинома желуца; иста студија је такође потврдила да *COPB2* може имати важно место у генској терапији карцинома желуца (60). У неколико клиничких студија спроведена су додатна лабораторијска истраживања у *in vitro* условима. У истраживању *Sudo et al.*, снижене вредности експресије *COPB2* индуковале су апоптозу и потиснуле раст тумора у *in vitro* условима на мишевима (82). *Wang et al.* открили су да је генска експресија *COPB2* знатно израженија у ткивима малигне болести дебелог црева него у нормалним ткивима (57). Ови резултати указују да *COPB2* може бити укључен у патогенезу карцинома дебелог црева код људи. Повећана експресија *COPB2* у ћелијама карцинома простате је такође потврђена. Експресија *COPB2* била је већа у малигном него у нормалном ткиву (58). Да би се утврдио клинички значај *COPB2* протеина, рађене су студије током којих је потврђено да је висока експресија *COPB2* повезана са ниском стопом 5-годишњег преживљавања (58). У студији која пореди вредности експресије *COPB2* у нормалном и малигном ткиву дојке, закључено је да су повишене вредности експресије *COPB2* код карцинома дојке, а такође могу указати и на постојање метастатских промена код малигне болести дојке (61). Карцином дојке је естроген - зависан тумор. На основу претходних истраживања, која су указала на важност у промени експресије *COPB2*,

отворило се питање да ли овај унутарћелијски транспортни механизам има значаја и у настанку и развоју карцинома ендометријума, најчешће естроген зависног малигнитета.

Значај фамилије гена *Bcl-2* у процесу апоптозе је већ доказан бројним експерименталним и клиничким испитивањима. Објављен је велики број радова у којима је одређивана експресија *Bcl-2* код пацијената оболелих од карцинома ендометријума (44,45,46). Иако је висока експресија *Bcl-2* гена пронађена код пацијенткиња које имају малигну болест, поједине студије су указале на ниску експресију (83, 84). Раније студије које су испитивале експресивност *Bcl-2*, као разлог за ниску експресију објасниле су узимањем ткива од пацијенткиња са хиперплазијом ендометријума за контролну групу, што је био случај и у овом истраживању. Нарушена хомеостаза и диференцијација код малигно промењених ћелија ендометријума показивала је нижу експресију у односу на ћелије хиперпластичног ендометријума (46,85,86). Узевши у обзир значај *Bcl-2* за процес апоптозе, вредности експресије *Bcl-2* гена су служиле као упоредни параметар, пошто студије које испитују експресију *COPB2* у ћелијама ендометријума код пацијената у раним стадијумима болести до сада нису рађене. Оба протеина учествују у регулисању ћелијског циклуса и правилног раста и диференцијације ћелија процесом апоптозе (57,87).

4.3 Добијени резултати релативне експресије *COPB2* и *Bcl-2* у ћелијама ендометријума

Свих 40 пацијенткиња из експерименталне групе су биле у почетним стадијумима болести и без присуства метастаза, болест је била локализована само на материци (Графикон 2). Подела је урађена по најновијој *FIGO* класификацији из 2023. године. Са графикана се види да је највише пацијенткиња било у првом Б стадијуму (37,50%); стадијум који се карактерише неагресивним типом карцинома и инвазијом миометријума тела материце, а без присуства лимфоваскуларних метастаза (88). Све пацијенткиње које су ушле у други стадијум су имале неки од агресивних типова што их је по новој класификацији сврставало у овај стадијум. Ни код ових пацијенткиња није дошло до ширења болести ван материце. Највећи број пацијенткиња био је у првом стадијуму 72,5%. (Графикон 2).

Вредности експресије *Bcl-2* у оквиру експерименталне групе пацијената су биле више у IA и IB у односу на наредне стадијуме (Графикон 3). Експресија *Bcl-2* није указивала на битну улогу у напредовању болести и није имала тренд раста у вишим *FIGO* стадијумима на шта су указале поједине студије (83). Могуће је да након настанка малигне болести неки други фактори доприносе више у даљем току и развоју малигнитета (89).

Вредности експресије *COPB2* у оквиру експерименталне групе пацијената су биле више у IA и IB у односу на наредне стадијуме (Графикон 4). Као и код *Bcl-2* највише вредности експресије су биле у ова два стадијума. Са графикана 3 и 4 се јасно види да су вредности релативне експресије ова два гена у скоро идентичном односу за сваки *FIGO* стадијум.

Подела је направљена и према хистолошком градусу. У односу на хистолошки градус тумора највише пацијенткиња је са другим градусом, 45% (Графикон 5). Заједно први и други градус су чинили укупно 82% свих пацијенткиња, а према последњој класификацији *FIGO* 2023 све оне су за ендометриоидне карциноме припадале неагресивним типовима карцинома. Осталих 7 пацијенткиња (18%) су биле у трећем градусу, од који су две биле ендометриоидни тип аденокарцинома и пет су биле агресивни типови што их је по новој класификацији сврставало у трећи градус.

Обзиром да није било ширења болести ван материце, све су биле у почетним стадијумима болести.

Према хистолошком градусу испитиване су вредности релативне експресије оба гена. Пацијенткиње које су припадале Г1 имале су највише вредности експресије за *COPB2* и *Bcl-2*, потом следе пацијенткиње у Г2 и најмање вредности експресије ова два гена су биле у Г3. Вредности релативне експресије као што се види на стубичастим дијаграмима за оба гена су биле сличног односа према одговарајућем градусу (Графикон 6 и Графикон 7). Овакви резултати који су показали више вредности експресије за *Bcl-2* у добродиферентованим карциномима поклапају се са ранијим испитивањима. У студији коју су радили *Mourizikou et al.* показало се да су вредности експресије *Bcl-2* биле значајно више у првом градусу у односу на више градусе ендометриоидног карцинома. (52). Друге студије у којима су добијени слични резултати су претпоставиле да смањена експресија *Bcl-2* код узнапредовалог малигнитета може одражавати губитак ћелијске хомеостазе и диференцијације (89).

Примарни циљ ове студије је био на процени утицаја експресије *COPB2* и *Bcl-2* у ћелијама ендометријума код пацијената у почетним стадијумима карцинома, без метастаза или ширења болести на околне структуре. Применом Ман-Витнијевог У теста утврђено је да постоји статистички значајна разлика у вредностима експресије гена *COPB2* и *Bcl-2* између пацијенткиња са карциномом ендометријума и без карцинома (Табела 24). Резултати су приказани графички (стубичасти дијаграм) на којима се уочавају значајно мање вредности експресивности *Bcl-2* код пацијенткиња са карциномом ендометријума ($M=0,008$) у односу на оне без карцинома ($M=0,015$) (Графикон 24). Поремећај експресије *Bcl-2* који ремети процес апоптозе доводи до настанка карцинома ендометријума. Добијени резултати се поклапају са претходно рађеним студијама на ткиву карцинома ендометријума (86). Неке друге студије су указале на повишен ниво експресије *Bcl-2* код карцинома ендометријума у односу на нормално ткиво (53). Ова недоследност резултата објашњава се на неколико начина. Пре свега као што је речено губитак ћелијске хомеостазе и диференцијације може довести до смањене експресије гена (89). Други разлог је што су контролну групу чиниле пацијенткиње са хиперплазијом ендометријума код којих свакако долази до поремећаја апоптозе али уз очувану ћелијску хомеостазу у односу на малигно промењене ћелије. Према томе, добијени резултати се поклапају са студијама које су конфигурисане попут ове. Применом Ман-Витнијевог У теста утврђено је да постоји статистички значајна разлика ($P<0,005$) у вредностима експресије гена *COPB2* између пацијенткиња са карциномом ендометријума и без карцинома ендометријума (Табела 25). Поремећај експресије гена за *COPB2* у ћелијама ендометријалног ткива значајан је фактор који доводи до настанка карцинома ендометријума. Доказане су значајно мање вредности експресије гена *COPB2* код пацијенткиња са карциномом ендометријума ($M=0,012$) у односу на оне без карцинома ($M=0,061$) (Графикон 25). Релативна експресија овог гена до сада није упоређивана код карцинома ендометријума у односу на хиперплазију ендометријума. У истраживањима на више различитих типова карцинома, вредности су у већини случаја биле повишене (91). Ови резултати се не поклапају са претходним студијама, али обзиром да овај ген има улогу унутарћелијског модулатора очекивали смо да ће пратити експресију *Bcl-2*. Вредности релативне експресије *COPB2* гена који је испитиван током ове студије су такође пратиле тренд експресије *Bcl-2*. Применом Ман-Витнијевог У теста утврђено је да постоји статистички значајна разлика у вредностима експресије гена *Bcl-2* између пацијенткиња са карциномом ендометријума и без карцинома (Табела 26). Могућа објашњења за ниже вредности експресије *COPB2* у контролној у односу на експерименталну групу свакако могу бити као и код *Bcl-2*. Пре свега, контролна група

пацијенткиња са хиперплазијом ендометријума и свакако губитак ћелијске диференцијације и хомеостазе код малигно промењених ћелија. Доказ за ово би могле бити добијене највише вредности експресије *COPB2* у Г1 хистолошком градусу (Графикон 7). Јасно је да испитивања овог гена тек предстоје, а на будућим студијама је да утврде његов значај и улогу у карциногенези.

У даљем раду користила се РОЦ крива (*ROC-Receiver Operating Characteristic*) за испитивање дијагностичког потенцијала ова два гена. За експресију *Bcl-2* гена површина испод криве (*AUC- Area Under the Curve*) износи 0,666 и овај резултат је статистички значајан ($p=0,038$) (Табела 27, Графикон 26). Када је у питању експресија *COPB2* површина испод криве (*AUC*) износи 0,877 и овај резултат је статистички значајан ($p=0,000$) (Табела 29, Графикон 27). За оба гена је приказан значајан дијагностички потенцијал у раздвајању пацијенткиња оболелих од карцинома и здравих пацијенткиња, али треба нагласити да је дијагностички потенцијал *COPB2* гена специфичнији.

Увидевши значајан дијагностички потенцијал за диференцијацију оболелих и здравих пацијенткиња, даље испитивање водило је одређивању граничних вредности које могу довести до настанка карцинома ендометријума. Преломна вредност се одређује за максималну вредност производа сензитивности и специфичности и за *Bcl-2* она износи 0,016 (Табела 28). Преломна вредност за *COPB2* износи 0,028 (Табела 30). Добијање ове вредности примену би требало да нађе пре свега код пацијенткиња у репродуктивном периоду које нису завршиле рађање. Као што је раније речено, овај регулаторни механизам игра битну улогу у настанку карцинома и код појединих малигнитета се може користити као прогностички параметар за постојање метастаза, стопу преживљавања или као помоћ при одређивању терапије-генска терапија (58,61,92). Резултати ове студије би могли пронаћи клиничку примену у терапији пацијенткиња које се одлуче на лечење у сврху задржавања фертилности. Уобичајен приступ лечења ових пацијенткиња се заснива на хистероскопији, експлоративној киретажи, примени прогестеронских препарата у виду интраутерусног улошка (*IUDs*) и/или интрамускуларну примену агониста гонадотропин ослобађајућег хормона (*Gonadotropin-releasing hormone-GnRH*) (93,94,95,96). Због промене навика и стила живота, све више пацијенткиња одлаже рађање. Са старењем повећава се и вероватноћа за појавом коморбидитета па тако и малигних болести. Код појединих жена је жеља за рађањем толико велика да се коси са медицинским протоколима. Овим пацијенткињама се бави посебна гинеколошка грана, онкофертилитет, која мултидисциплинарним приступом и конзилијарним одлукама покушава да очува фертилитет пацијенткиња. Међутим, и поред значајног напретка медицине и дијагностичких процедура, некада није једноставно донети одлуку о даљем лечењу. Испитивање поремећаја на ћелијском нивоу, нарушавање хомеостазе и диференцијације ћелије, ново је поље које би нам могло помоћи у лечењу и праћењу пацијенткиња. Истраживање нас наводи да би у будућности требало тражити одговоре на молекуларном нивоу. Преломне вредности експресије *COPB2* могу бити водич да се пронађу и други био-маркери који удружени могу помоћи у дијагностиковању и персонализованом лечењу појединих пацијенткиња.

Ова студија је показала да се молекуларне промене које се догађају на ћелијском нивоу и које доводе до поремећаја ћелијске хомеостазе морају уврстити у неке будуће протоколе дијагностиковања и лечења карцинома ендометријума.

5 ЗАКЉУЧАК

На основу спроведеног истраживања закључује се следеће:

Вредности релативне експресије гена *COPB2* и *Bcl-2* су снижене у почетним стадијумима карцинома ендометријума.

Поремећај експресије гена *COPB2* и *Bcl-2* нарушава процес апоптозе и може утицати на настанак карцинома ендометријума.

Одређивање граничне вредности експресије *COPB2* и *Bcl-2* би могло утицати на ток и исход лечења код појединих група пацијенткиња.

6 ЛИТЕРАТУРА

1. Alan H. DeCherney, Lauren Nathan, Neri Laufer, Ashley S. Roman, Current Diagnosis & Treatment Obstetrics & Gynecology.
2. Hoffman BL, Schorge JO, Bradshaw KD, Halvorson LM, Schaffer JI, Corton MM, Williams gynecology, third edition, McGraw-Hill Education. 2016; 702-703.
3. World cancer research fund. Endometrial cancer statistics. 2018. [Интернет] Доступно на: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/endometrial-cancer-statistics>
4. Đurđević S, Kesić V. Ginekološka onkologija, Udruženje za ginekološku onkologiju Srbije (UGOS), Medicinski fakultet u Novom Sadu. 2009; 177-198.
5. Gu M, Shi W, Barakat RR et al: Pap smears in women with endometrial carcinoma. Acta Cytol 45(4): 555, 2001.
6. Powell JL, Hill KA, Shrio BC, et al: Preoperative serum CA-125 levels in treating endometrial cancer. J. Reprod Med 50(8): 585, 2005.
7. Alcázar JL, Pineda L, Caparrós M, Utrilla-Layna J, Juez L, Mínguez JA, Jurado M. Transvaginal/transrectal ultrasound for preoperative identification of high-risk cases in well- or moderately differentiated endometrioid carcinoma. Ultrasound Obstet Gynecol. 2016 Mar;47(3):374-9.
8. Mori T, Kato H, Kawaguchi M, Hatano Y, Ishihara T, Noda Y, Hyodo F, Matsuo M, Furui T, Morishige KI. A comparative analysis of MRI findings in endometrial cancer: differentiation between endometrioid adenocarcinoma, serous carcinoma, and clear cell carcinoma. Eur Radiol. 2022 Jun;32(6):4128-4136.
9. Kulkarni R, Bhat RA, Dhakharia V, Kallur K, Gangoli A. Role of Positron Emission Tomography/Computed Tomography in Preoperative Assessment of Carcinoma Endometrium-a Retrospective Analysis. Indian J Surg Oncol. 2019 Mar;10(1):225-231.
10. Nagar H, Dobbs S, McClelland HR, et al: The diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging in detecting cervical involvement in endometrial cancer. Gynecol Oncol 103(2): 431, 2006.
11. Bourne TH, Campbell S, Steer CV, Royson P, Whitehead MI, Collins WP. Detection of endometrial cancer by transvaginal ultrasonography with colour flow imaging and blood flow analysis: a preliminary report. Gynecol Oncol 1991; 40: 253-259.
12. Chen CY, Wu YC, Yen MS, Hung JH, Yuan CC, Chao KC. The power Doppler velocity index, pulsatility index, and resistive index can assist in making a differential diagnosis of primary ovarian carcinoma and Krukenberg tumors: a preliminary study. J Ultrasound Med. 2007 Jul;26(7):921-6; quiz 927-9.
13. Clarke MA, Long BJ, Sherman ME, Lemens MA, Podratz KC, Hopkins MR, Ahlberg LJ, Mc Guire LJ, Laughlin-Tommaso SK, Bakkum-Gamez JN, Wentzensen N. Risk assessment of endometrial cancer and endometrial intraepithelial neoplasia in women with abnormal bleeding and implications for clinical management algorithms. Am J Obstet Gynecol. 2020 Oct;223(4):549.e1-549.e13.
14. Bartosch C, Pires M, Jerónimo C, Lopes JM. The role of pathology in the management of patients with endometrial carcinoma. Future Oncol. 2017 May;13(11):1003-1020.

15. Feldman S, Berkowitz RS, Tosteson AN: Cost-effectiveness of strategies to evaluate postmenopausal bleeding. *Obstet Gynecol* 81(6): 968, 1993.
16. Obermair A, Geramou M, Gucer F, et al: Does hysteroscopy facilitate tumor cell dissemination? Incidence of peritoneal cytology from patients with early stage endometrial carcinoma following dilatation and curettage (D & C) versus hysteroscopy and D & C. *Cancer* 88(1): 139, 2000.
17. Jonathan SB, Xavier M-G, Carien C, Christina F, David G, Sean K, Kristina L, David M, Nicole C: FIGO staging of endometrial cancer: 2023. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, Volume 162, Issue 2, 383-785, 2023.
18. Colombo N, Creutzberg C, Amant F, et al. ESMO-ESGO-ESTRO consensus conference on endometrial cancer: diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016;27(1):16-4.
19. Soslow RA, Tornos C, Park KJ, Malpica A, Matias-Guiu X, Oliva E, Parkash V, Carlson J, McCluggage WG, Gilks CB. Endometrial Carcinoma Diagnosis: Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice: Recommendations of the International Society of Gynecological Pathologists. *Int J Gynecol Pathol*. 2019 Jan;38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1):S64-S74.
20. Obradović D. et al. Karcinom endometrijuma- angiogeneza i osvrt na uloge vaskularnog endotelnog faktora rasta. *MedPodml* 2022, 73(4):8-13.
21. FIGO Committee on Gynecological Cancer. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix and endometrium. *Int J Gynecol Obstet*. 2009;105:103- 104.
22. Kapucuoglu N, Bulbul D, Tulunay G, Temel MA. Reproducibility of grading systems for endometrial endometrioid carcinoma and their relation with pathologic prognostic parameters. *Int J Gynecol Cancer*. 2008 Jul-Aug;18(4):790-6.
23. Mitric C, Bernardini MQ. Endometrial Cancer: Transitioning from Histology to Genomics. *Curr Oncol*. 2022 Jan 31;29(2):741-757.
24. Crosbie EJ, Kitson SJ, McAlpine JN, Mukhopadhyay A, Powell ME, Singh N. Endometrial cancer. *Lancet*. 2022;399(10333):1412-28.
25. Mutch DG: The new FIGO staging system for cancers of the vulva, cervix, endometrium and sarcomas. *Gynecol Oncol* 115(3): 325, 2009.
26. Homsley HD, Filiaci V, Gibbons SK et al: A randomized phase III trial in advanced endometrial carcinoma of surgery and volume directed radiation followed by cisplatin and doxorubicin with or without paclitaxel: a Gynecologic Oncology group study. *Gynecol Oncol* 12: 543, 2009.
27. Barrera Medel NI, Bansal S, Miller DS, et al: Pharmacotherapy of endometrial cancer. *Expert Opin Pharmacother* 10(12):1939, 2009.
28. Chao CK, Grigsby PW, Perez CA, et al: Medically inoperable stage I endometrial carcinoma: a few dilemmas in radiotherapeutic management. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 34(1): 27, 1996.
29. Peiretti M, Congiu F, Ricciardi E, Maniglio P, Mais V, Angioni S. Conservative treatment for well-differentiated endometrial cancer: when and why it should be considered in young women. *Ecanermedicalscience*. 2019 Jan 16;13:892.
30. Montz FJ, Bristow RE, Boviceli A, et al: Intrauterine progesterone treatment of early endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 186(4): 651, 2002.
31. Wang N, Zhang J, Fan X, Ma J, He J, Kang S, Cheng J, Ma J. Identification of risk factors for the prognosis of Chinese patients with endometrial carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Sep 24;100(38):e27305.
32. Geels YP, Pijnenborg JM, van den Berg-van Erp SH, Bulten J, Visscher DW, Dowdy SC, Massuger LF. Endometrioid endometrial carcinoma with atrophic endometrium and poor prognosis. *Obstet Gynecol*. 2012 Nov;120(5):1124-31.

33. Krusun S, Pesee M, Rasio W, Tangvoraphonkchai V, Supaadirek C, Thamronganantasakul K, Supakalin N, Padoongcharoen P. Survival rate of early stage endometrioid adenocarcinoma of endometrium treated at Srinagarind Hospital. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(5):2217-20.
34. Mills AM, Longacre TA. Endometrial hyperplasia. *Semin Diagn Pathol*. 2010 Nov;27(4):199-214.
35. Nees LK, Heublein S, Steinmacher S, Juhasz-Böss I, Brucker S, Tempfer CB, Wallwiener M. Endometrial hyperplasia as a risk factor of endometrial cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2022 Aug;306(2):407-421.
36. Ring KL, Mills AM, Modesitt SC. Endometrial Hyperplasia. *Obstet Gynecol*. 2022 Dec 1;140(6):1061-1075.
37. Trimble CL, Kauderer J, Zaino R, et al. Concurrent endometrial carcinoma in woman with a biopsy diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 2006; 106: 812-819.
38. Auclair MH, Yong PJ, Salvador S, Thurston J, Colgan TTJ, Sebastianelli A. Guideline No. 390-Classification and Management of Endometrial Hyperplasia. *J Obstet Gynaecol Can*. 2019 Dec;41(12):1789-1800.
39. Jilderda LJ, Zhou L, Foijer F. Understanding How Genetic Mutations Collaborate with Genomic Instability in Cancer. *Cells*. 2021 Feb 6;10(2):342.
40. Chi DS, Berchuck A, Diyon DS, Yashar CM, Principles and Practice of Gynecologic Oncology, seventh edition, Wolters Kluwer. 2017; 100-131.
41. Smolarz B, Michalska M M , Samulak D, Wójcik L, Romanowicz H, Studies of Correlations Between Single Nucleotide Polymorphisms of DNA Repair Genes and Endometrial Cancer in Polish Women, *International Journal of Cancer Research and Treatment*. 2018; vol 38, no. 9, pp. 5223-5229.
42. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516.
43. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016 Apr;8(4):603-19.
44. Hu J, Xu M, Dai Y, Ding X, Xiao C, Ji H, Xu Y. Exploration of Bcl-2 family and caspases-dependent apoptotic signaling pathway in Zearalenone-treated mouse endometrial stromal cell, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016; 476: 553-559.
45. Trabzonlu L, Muezzinoglu B, Corakci A. BCL-2 and PAX2 Expressions in EIN which Had Been Previously Diagnosed as Non-Atypical Hyperplasia, *Pathology & Oncology Research*. 2019; 25: 471–476.
46. Vaskivuo TE, Stenbäck F, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor- α , and NF- κ B in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer*. 2002; 95: 1463–1471.
47. Bruckheimer EM, Cho SH, Sarkiss M, Herrmann J, McDonnell TJ. The Bcl-2 gene family and apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 1998;62:75-105.
48. Dietrich JB. Apoptose et gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 [Apoptosis and anti-apoptosis genes in the Bcl-2 family]. *Arch Physiol Biochem*. 1997 Apr;105(2):125-35. French.
49. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al: Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226:1097-1099, 1984.
50. Chen-Levy Z, Clearly ML: Membrane topology of the bcl-2 proto-oncogenic protein demonstrated in vitro. *J. Biol.Chem.*25: 4929-4933, 1990.

51. Korsmeyer SJ: Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80: 879-886, 1992.
52. Mourizikou A, Kosmask K, Marouga A, Stamouli M, Pouliakis A, Karakitsos P. The use of an immunocytochemical double-labelling staining can display the distribution of Bcl-2/Ki-67 cells in endometrial adenocarcinoma as well as in normal endometrium. *Clin Lab*. 2012;58:133–44.
53. Marone M, Ferrandina G, Macchia G, Mozzetti S, de Pasqua A, Benedetti-Panici P, et al. Bcl2, Bax, Bcl-x(L) and Bcl-x(s) expression in neoplastic and normal endometrium. *Oncology*. 2000;58:161–8.
54. Presley JF, Ward TH, Pfeifer AC, Siggia ED, Phair RD and Lippincott-Schwartz J: Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. *Nature*. 2002; 417: 187-193.
55. Pu X, Wang J, Li W, Fan W, Wang L, Mao Y, Yang S, Liu S, Xu J, Lv Z, Xu L, Shu Y. COPB2 promotes cell proliferation and tumorigenesis through up-regulating YAP1 expression in lung adenocarcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 103: 373–380.
56. Beck R, Ravet M, Wieland FT, Cassel D: The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Letters* . 2009;583(17):2701–2709.
57. Wang Y, Chai Z, Wang M, Jin Y, Yang A, Li M. COPB2 suppresses cell proliferation and induces cell cycle arrest in human colon cancer by regulating cell cycle-related proteins. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018; 15: 777-784.
58. Mi Y, Sun C, Wei B, Sun F, Guo Y, Hu Q, Ding W, Zhu L, Xia G. Coatamer subunit beta 2 (COPB2), identified by label-free quantitative proteomics, regulates cell proliferation and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018; 495: 473-480.
59. Li Z.-S, Liu C.-H, Liu Z, Zhu C.-L, Huang Q. Downregulation of COPB2 by RNAi inhibits growth of human cholangiocellular carcinoma cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2018; 22: 985-992.
60. An C, Li H, Zhang X, Wang J, Qiang Y, Ye X, Li Q, Guan Q, Zhou Y. Silencing of COPB2 inhibits the proliferation of gastric cancer cells and induces apoptosis via suppression of the RTK signaling pathway. *International Journal of Oncology*. 2019; 54: 1195-1208.
61. Bhandari A, Zheng C, Sindan N, Sindan N, Quan R, Xia E, Thapa Y, Tamang D, Wang O, Ye X, Huang D. COPB2 is up-regulated in breast cancer and plays a vital role in the metastasis via N-cadherin and Vimentin. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2019; 00:1-11.
62. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987; 162 (1): 156-159.
63. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000; 25: 169-193.
64. Zhai W, Jeong H, Cui L, Krainc D, Tjian R. In vitro analysis of huntingtin-mediated transcriptional repression reveals multiple transcription factor targets. *Cell*. 2005; 7: 1241-1253.
65. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008; 3/6: 1101-1108.
66. Vukićević, D., Ž. Perišić, V. Plešinac Karapandžić, M. Vančetović Mijović, B. Đerković, L. Vitković, and N. Mitić. "Karcinom endometrijuma." *Praxis medica* 36, no. 3-4 (2008): 103-10.

67. Grandi G, Perrone AM, Chiossi G, Friso S, Toss A, Sammarini M, Facchinetti F, Botticelli L, Palma F, De Iaco P. Increasing BMI is associated with both endometrioid and serous histotypes among endometrial rather than ovarian cancers: a case-to-case study. *Gynecol Oncol.* 2019 Jul;154(1):163-168.
68. Bittoni MA, Fisher JL, Fowler JM, Maxwell GL, Paskett ED. Assessment of the effects of severe obesity and lifestyle risk factors on stage of endometrial cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013 Jan;22(1):76–81.
69. Dimou N, Omiyale W, Biessy C, Viallon V, Kaaks R, O'Mara TA, Aglago EK, Ardanaz E, Bergmann MM, Bondonno NP, Braaten T, Colorado-Yohar SM, Crous-Bou M, Dahm CC, Fortner RT, Gram IT, Harlid S, Heath AK, Idahl A, Kvaskoff M, Nøst TH, Overvad K, Palli D, Perez-Cornago A, Sacerdote C, Sánchez MJ, Schulze MB, Severi G, Simeon V, Tagliabue G, Tjønneland A, Truong T, Tumino R, Johansson M, Weiderpass E, Murphy N, Gunter MJ, Lacey B, Allen NE, Dossus L. Cigarette Smoking and Endometrial Cancer Risk: Observational and Mendelian Randomization Analyses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2022 Sep 2;31(9):1839-1848.
70. Felix AS, Yang HP, Gierach GL, Park Y, Brinton LA. Cigarette smoking and endometrial carcinoma risk: the role of effect modification and tumor heterogeneity. *Cancer Causes Control.* 2014 Apr;25(4):479-89.
71. Larsson SC, Carter P, Kar S, Vithayathil M, Mason AM, Michaëlsson K, Burgess S. Smoking, alcohol consumption, and cancer: A mendelian randomisation study in UK Biobank and international genetic consortia participants. *PLoS Med.* 2020 Jul 23;17(7):e1003178.
72. Burchardt NA, Shafrir AL, Kaaks R, Tworoger SS, Fortner RT. Oral contraceptive use by formulation and endometrial cancer risk among women born in 1947-1964: The Nurses' Health Study II, a prospective cohort study. *Eur J Epidemiol.* 2021 Aug;36(8):827-839.
73. Zhu B, Qu S. The Relationship Between Diabetes Mellitus and Cancers and Its Underlying Mechanisms. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Feb 11;13:800995.
74. Wang Y, Zeng X, Tan J, Xu Y, Yi C. Diabetes mellitus and endometrial carcinoma: Risk factors and etiological links. *Medicine (Baltimore).* 2022 Aug 26;101(34):e30299.
75. Han J, Zhang L, Guo H, Wysham WZ, Roque DR, Willson AK, Sheng X, Zhou C, Bae-Jump VL. Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. *Gynecol Oncol.* 2015 Sep;138(3):668-75.
76. Lynch H.T., Snyder C.L., Shaw T.G., Heinen C.D., Hitchins M.P. Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015. *Nat. Rev. Cancer.* 2015;15:181–194 / Zhao S, Chen L, Zang Y, Liu W, Liu S, Teng F, Xue F, Wang Y. Endometrial cancer in Lynch syndrome. *Int J Cancer.* 2022 Jan 1;150(1):7-17.
77. Raffone A, Travaglino A, Gabrielli O, Micheli M, Zuccalà V, Bitonti G, et al. Clinical features of ProMisE groups identify different phenotypes of patients with endometrial cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* 2021; 303: 1393–1400.
78. Ouh Y, Cho HW, Lee JK, et al. PR039/#272 Value of the new endometrial cancer risk molecular categorization system 2020 ESGO/ESTRO/ESP in predicting survival and recurrence, *International Journal of Gynecologic Cancer* 2023;33:A51-A52.
79. Imboden S, Nastic D, Ghaderi M, et al, 836 Implementation of the 2021 molecular ESGO/ESTRO/ESP risk groups in endometrial cancer *International Journal of Gynecologic Cancer* 2021;31:A126-A127.

80. Betella I, Fumagalli C, Rafaniello Raviele P, *et al.*, A novel algorithm to implement the molecular classification according to the new ESGO/ESTRO/ESP 2020 guidelines for endometrial cancer. *International Journal of Gynecologic Cancer* 2022;32:993-1000.
81. Biao W, Yumeng W, Xianlin G, Yanping Y, Yuanyuan L, Xiao H, Yuanbin C, Wenjing Z, Jibin L, Xuming W, Aiguo S and Suqing Z, An Integrative Pan-Cancer Analysis of the Oncogenic Role of COPB2 in Human Tumors, *BioMed Research International* Volume 2021, Article ID 7405322, 18 pages.
82. Sudo H, Tsuji AB, Sugyo A, Kohda M, Sogawa C, Yoshida C, *et al.* Knockdown of COPA, identified by loss-of-function screen, induces apoptosis and suppresses tumor growth in mesothelioma mouse model. *Genomics*. 2010; 95: 210–216.
83. Erkanli S, Eren F, Pekin S, Bagis T. BCL-2 and P53 expression in endometrial carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2004;23:97–103.
84. Porichi O, Nikolaidou ME, Apostolaki A, Tserkezoglou A, Arnogiannaki N, Kassanos D, *et al.* BCL-2, BAX and P53 expression profiles in endometrial carcinoma as studied by real time PCR and immunohistochemistry. *Anticancer Research*. 2009; 29: 3977–3982.
85. Allison KH, Tenpenny E, Reed SD, Swisher EM, Garica RL. Immunohistochemical markers in endometrial hyperplasia: is there a panel with promise. A review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16:329–43.
86. Niemann TH, Trgovac TL, McGaughy VR, Vaccarello L. Bcl2 expression in endometrial hyperplasia and carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1996;63:318–22.
87. Korsmeyer SJ: Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80: 879-886, 1992.
88. Jonathan SB, Xavier M-G, Carien C, Christina F, David G, Sean K, Kristina L, David M, Nicole C: FIGO staging of endometrial cancer: 2023. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, Volume 162, Issue 2, 383-785, 2023.
89. Laban M, Ibrahim EA, Agur W, Elddin Ahmed AMB. Bcl-2 may play a role in the progression of endometrial hyperplasia and early carcinogenesis, but not linked to further tumorigenesis^{*}. *J Microsc Ultrastruct*. 2015 Jan-Mar;3(1):19-24.
90. Marone M, Ferrandina G, Macchia G, Mozzetti S, de Pasqua A, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Scambia G. Bcl-2, Bax, Bcl-x(L) and Bcl-x(S) expression in neoplastic and normal endometrium. *Oncology*. 2000 Feb;58(2):161-8.
91. Wu B, Wu Y, Guo X, Yue Y, Li Y, He X, Chen Y, Zhao W, Liu J, Wu X, Shen A, Zhang S. An Integrative Pan-Cancer Analysis of the Oncogenic Role of COPB2 in Human Tumors. *Biomed Res Int*. 2021 Oct 12;2021:7405322.
92. Zhang Z, Wang T, Liu Z, Tang S, Yue M, Feng S, *et al.* Small interfering RNA targeting of the survivin gene inhibits human tumor cell growth in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017; 14: 35–42.
93. Giampaolino P, Di Spiezio Sardo A, Mollo A, Raffone A, Travaglino A, Boccellino A, Zizolfi B, Insabato L, Zullo F, De Placido G, Bifulco G. Hysteroscopic Endometrial Focal Resection followed by Levonorgestrel Intrauterine Device Insertion as a Fertility-Sparing Treatment of Atypical Endometrial Hyperplasia and Early Endometrial Cancer: A Retrospective Study. *J Minim Invasive Gynecol*. 2019 May-Jun;26(4):648-656.
94. Etrusco A, Laganà AS, Chiantera V, Mikuš M, Arsalan HM, d'Amati A, Vitagliano A, Cicinelli E, Favilli A, D'Amato A. Reproductive and Oncologic Outcomes in Young Women with Stage IA and Grade 2 Endometrial Carcinoma Undergoing Fertility-Sparing Treatment: A Systematic Review. *Biomolecules*. 2024 Mar 5;14(3):306.

95. Wei H, Pan N, Zhang W, Xiong G, Guo W, Dong Z, Ma C. Levonorgestrel-releasing intrauterine system-based therapies for early-stage endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Gynecol Oncol.* 2023 Mar;34(2):e36.
96. Gunderson CC, Fader AN, Carson KA, Bristow RE. Oncologic and reproductive outcomes with progestin therapy in women with endometrial hyperplasia and grade 1 adenocarcinoma: a systematic review. *Gynecol Oncol.* 2012 May;125(2):477-82.

БИОГРАФИЈА

Бранко М. Андрић, рођен 1983. године. 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. 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 и положио специјалистички испит 2020 године са одличном (5) оценом. Ради у диспанзеру за здравствену заштиту жена у Дому Здравља у Рашкој. Говори Енглески језик. Ожењен, отац четворо деце.

Учествовао на више стручних конгреса у земљи и иностранству, на неким од њих са ауторским радом *OMI (Open Medical Institute) seminars* 2021 и 2023 у Салцбургу, Аустрија. У периоду од 01.07.-31.07.2022. године усавршавао се месец дана у Бечу на *AKH (Allgemeines Krankenhaus)*, одељење Гинекологије и акушерства, одсеци: Перинатологије, Гинеколошке онкологије и Ендоскопске хирургије под менторством *Univ.-Prof. DDr. Harald Leitich, MBA*, шеф катедре за медицинско образовање и последипломску обуку.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Branko Andrić**, Danijela Cvetković, Stefan Blagojević, Marko Stanković , Nenad Kokošar, Dragutin Sretenović, Dragiša Šljivančanin, Branislav Milošević, Danijela Milošev, Petar Arsenijević, Expression Analysis of COPB2 and Bcl-2 in Early Stages of Endometrial Carcinoma. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 2023; 50(12): 254 doi.org/10.31083/j.ceog5012254
2. Blagojević S, **Andrić B**, Jovankić J, Milutinović M, Nikodijević D, Arsenijević P, Cvetković D. MicroRNA expression as a diagnostic parameter in early endometrial cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2023 Sep 4; 33(9):1394-1401. doi: 10.1136/ijgc-2023-004579. PMID: 37541686. IF: 4.8; **M21**
3. **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. P. Arsenijevic, A. Zivanovic, Z. Protrka, A. Dimitrijevic, M. Sorak, T. Vulovic, G. Vukcevic Globarevic, Z. Vilendecic, **B. Andric**, S. Arsenijevic. (2018). Cervical breaking point; a phenomenon unveiled during cintnuos controllable ballon dilatation. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, Vol. XLV, No. 6, doi: 10.12891/ceog4227. 2018

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

УЛОГА ЕКСПРЕСИЈЕ СОРВ2 И ПРОЦЕСА АПОПТОЗЕ У НАСТАНКУ
КАРЦИНОМА ЕНДОМЕТРИЈУМА

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица.

У Крагујевцу, 2024. године.


Бранко Андрић
потпис аутора

Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:
УЛОГА ЕКСПРЕСИЈЕ СОРВ2 И ПРОЦЕСА АПОПТОЗЕ У НАСТАНКУ
КАРЦИНОМА ЕНДОМЕТРИЈУМА
истоветне.

У Крагујевцу, 2024. године.



Бранко Андрић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, **Бранко Андрић,**

☒ дозвољавам
☐ не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

УЛОГА ЕКСПРЕСИЈЕ СОРВ2 И ПРОЦЕСА АПОПТОЗЕ У НАСТАНКУ КАРЦИНОМА ЕНДОМЕТРИЈУМА

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајнодоступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам
☐ не дозвољавам¹

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

¹Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 2024.године,


Бранко Андрић
потпис аутора

²Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>