

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

07. 10. 2020		ДНОСТ	
05	8560		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу број IV-03-594/36 од 09.09.2019. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Ане Луковић, под називом:

„Утицај мутације егзона FLCN гена, концентрације фоликулина и *phospho-s6* протеина на настанак примарног спонтаног пнеумоторакса”

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Зорица Лазић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник;
2. **Проф. др Биљана Љујић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, члан;
3. **Доц. др Иван Кухајда**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Хирургија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Кандидат Ана Луковић рођена је 13.02.1991. године у Крагујевцу. Интегрисане академске студије медицине на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу завршава 2016. године са просечном оценом 9,37 и стиче звање доктора медицине. Након завршених студија обавља обавезни стаж у Клиничком центру Крагујевац и Дому здравља Крагујевац у трајању од шест месеци. Докторске академске студије уписује 2016. године, изборно подручје Клиничка и експериментална хирургија на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Од 2016. године обавља послове фацилитатора за ужу научну област Анатомија, а од 2018. године за ужу научну област Хирургија. Од 2017. године је на специјализацији из Грудне хирургије.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: Утицај мутација егзона FLCN гена, концентрације фоликулина и *phospho-s6* протеина на настанак примарног спонтаног пнеумоторакса

Предмет: Циљ овог истраживања је да утврди значај мутација егзона FLCN гена и концентрације FLCN протеина, фоликулина на настанак и развој примарног спонтног пнеумоторакса.

Хипотеза: Мутација *FLCN* и промене концентрације *фоликулина* су директно повезани са настанком ПСП. *Phospho s6* протеин, маркер активације *mTOR* сигналног пута је у корелацији са настанком примарног спонтног пнеумоторакса.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини у часопису најмање категорије M51 у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Lukovic A, Arsenijevic M, Milisavljevic S, Stojkovic D, Mrvic S, Radovanovic D. Cystic lesions of anterior mediastinum: case report. Ser J Exp Clin Res 2020;21(2):185-8. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Примарни спонтани пнеумоторакс (ПСП) представља значајан глобални проблем са годишњом инциденцом од 7,4 – 18 / 100.000 код мушкараца и 1, 2 – 6 / 100.000 код жена. За разлику од секундарног спонтаног пнеумоторакса који се јавља код особа са доказаним плућним болестима, примарни спонтани пнеумоторакс се јавља код здравих особа млађег животног доба које немају познату плућну болест.

Настаје услед руптуре субплеуралних блебса или була, а сама патогенеза настанка истих и њихове спонтане руптуре је и даље непозната. Предложено је више теорија о механизму настанка ПСП, које укључују конгениталну основу, инфламацију, градијент притиска у плеуралном простору, као и генетску основу. Генетска основа болести је и даље непозната, иако се спонтани пнеумоторакс описује као компликација многих генетски предиспонираних болести, укључујући Марфанов синдром, цистичну фиброзу, хомоцистинурију, *Ehlers–Danlos* синдром, $\alpha 1$ -антитрипсин дефицијенцију и *Birt–Hogg–Dube* синдром.

Birt–Hogg–Dube синдром је аутозомно доминантни наследни поремећај са предиспозицијом за настанак плућних и бубрежних цисти, тумора бубрега и кожних лезија. Претходне студије указују да 16-24% пацијената са *Birt–Hogg–Dube* синдромом развије спонтани пнеумоторакс. У основи *Birt–Hogg–Dube* синдрома се описује мутација *FLCN* гена локализованог на кратком краку седамнаестог хромозома, који кодира *FLCN* протеин, фоликулин.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Главни циљ планираног истраживања је испитивање улоге мутација *FLCN* код пацијената са ПСП.

У складу са основним циљем, посављени су задаци студије:

1. Утврђивање присуства мутација *FLCN* код пацијената са примарним спонтаним пнеумотораксом;
2. Утврђивање концентracије фоликулина код пацијената са примарним спонтаним пнеумотораксом;
3. Испитивање последичне активације *mTOR* сигналног пута и активности *phospho s6* протеина.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Фоликулин је присутан у различитим ткивима, укључујући тип 1 пнеумоците, кожу и нефрон. Функција овог еволутивно конзервираног протеина није у потпуности дефинисана, а поједине студије описују његову улогу у *mTOR* сигналном путу. Улога у *mTOR* сигналног пута се објашњава активношћу *FNIP1* и *FNIP2* (*folliculin-interacting protein*) који се везују за 5'-АМР активирану протеинску киназу и негативно регулишу овај сигнални пут. Међутим, подељена су мишљења да ли овај протеин, као и његов недостатак, повећава или смањује активност *mTOR* сигналног пута.

TOR (*Target of rapamycin*) је еволуционо конзервирана серин/треонин киназа која постоји у два структурно и функционално карактеристична облика, *TOR1* и *TOR2*. *mTOR1* регулише ћелијски раст и транслацију протеина преко ефектора *p70S6K*, *S6RP*, и *4E-BP1* (*initiation factor 4E-binding protein 1*). *Phospho-S6* рибозомални протеин је један од маркера активности *mTOR* сигналног пута. Поједине студије показују да је нисходна (*down*) регулација фоликулина у корелацији са *mTOR1* сигналним путем и концентracијом *phospho-S6* рибозомалног протеина. На основу повећане експресије *phospho-mTOR*, *phospho-S6*, *HIF1 α* и *VEGF* на површини епитела плућних цисти пацијената са *Birt-Hogg-Dube* синдромом, постављене су хипотезе да ови молекули услед мутације *FLCN* гена и поремећене активације *mTOR* сигналног пута доприносе развоју плућних цисти.

Осим у овом сигналном путу, описана је и улога недостатка овог протеина у поремећају активности транскрипционог фактора *HIF1*, *TGF β* сигналног пута, као и у контроли синтезе рибозомске *RNA*. Такође, комплекс *FLCN/FNIP* регулише ћелијске функције као што су аутофагија, цитогенеза, функцију лизозома и излазак ћелије из плурипотенције. Из овога се закључује да губитак функције овог протеина утиче на губитак ћелијске метаболичке хомеостазе. Како су *FLCN* и ови сигнални путеви повезани са функцијом здравих плућа, формирањем плућних цисти и настанком примарног спонтаног пнеумоторакса је недефинисано.

Откривено је више од 100 различитих мутација у свих 14 кодирајућих егзона овог гена. Најчешће мутације *FLCN* гена у оквиру *Birt-Hogg-Dube* синдрома су инсерције, делеције, *nonsense* и *splice-site* мутације, а инсерција или делеција цитозина у 11 егзону овог гена је идентификована код 50% пацијената са *Birt-Hogg-Dube* синдромом. Међутим, претходна истраживања су показала да су мутације у егзону 9 и 12 чешће повезане са формирањем плућних цисти, него мутације у другим егзонима.

2.7. Метод истраживања

2.7.1. Врста студије

Компаративно експериментална студија

За потребе студије биће укључени пацијенти са примарним спонтаним пнеумотораксом који су били хоспитализовани у Одељењу грудне хирургије, Клиничког центра Крагујевац и у Клиници за грудну хирургију, Института за плућне болести Војводине, Сремска Каменица.

2.7.2. Популација која се истражује

У студију ће бити укључени пацијенти мушког или женског пола који припадају млађој популацији (старости од 16 до 35 година), без коморбидитета код којих је радиографским дијагностичким процедурама верификован примарни спонтани пнеумоторакс, без обзира да ли ради о првом јављању или о рецидиву ПСП-а. Контролна група ће бити здрава популација сличних карактеристика испитиваној популацији (старост, пол, конституција..). Применом комерцијалног програма G Power v.3.0.10 утврдили смо да је за дате критеријуме неопходан узорак од 55 пацијената са примарним спонтаним пнеумотораксом у испитиваној групи, као и 55 испитаника који ће чинити здрава популација у контролној групи.

2.7.3. Узорковање

У студији ће бити испитивани ткивни узорци (крв) пацијената са дијагностикованим примарним спонтаним пнеумотораксом.

Укључујући критеријуми су:

- 1) Потписан добровољни пристанак за учешће у студији
- 2) експериментална група: пацијенти мушког или женског пола који припадају млађој популацији (старости од 16 до 35 година), без коморбидитета код којих је радиографским дијагностичким процедурама верификован примарни спонтани пнеумоторакс, без обзира да ли ради о првом јављању или о рецидиву ПСП-а.
- 3) контролна група: здрава популација сличних карактеристика испитиваној популацији (старост, пол, конституција..).

Искључујући критеријуми су:

Старост испитаника испод 15 и изнад 35 година, пацијенти са доказаним обољењима плућа, пацијенти са трауматским пнеумотораксом, пацијенти са другим доказаним генетски предиспонираним обољењима.

Узорци крви пацијената са примарним спонтаним пнеумотораксом ће до тренутка анализе бити чувани са *EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)* као антикоагулансом. Мутације *FLCN* ће бити детектоване методом ланчане реакције полимеразе (енгл. *polimerase chain reaction, PCR*). Након информисаног пристанка пацијента, из узорка периферне крви биће изолована геномска ДНК, коришћењем кита за изолацију ДНК из крви (*Gene JET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Germany)*), по упутствима произвођача. Квалитет геномске ДНК ће се проверити на 2% агарози бојеној етидијум-бромидом. Електрофореза се врши у 0.5 TBE пуферу при струји од 40 mA и напону од 80 V у трајању од 20 мин. Интактност и квалитет геномске ДНК се анализира под UV светлошћу трансилуминатора (*Pharmacia LKB, Sveden*), где се очувана геномска ДНК уочава у виду једне јасне траке, док се деградирана ДНК може уочити присуством већег броја трака или у виду размаза. Из свих узорака биће изолована квалитетна геномска ДНК. Концентрација и чистоћа ДНК у узорку ће се одредити мерењем апсорбанце на таласној дужини од 260nm, коришћењем *Gene Quant* спектрофотометра (*Pharmacia LKB, Sveden*). Биће употребљени прајмери за амплификацију свих 14 егзона *FLCN*. 50 ng геномске ДНК ће бити обрађено *PCR* методом у тачно одређеним условима амплификације: 94°C током 5 минута, потом 10 циклуса на температураи од 94°C током 30 секунси, 61.5°C 30 секунди и 72°C 45 секунди, а затим још 30 циклуса на температури од 94°C током 30 секунди, 55°C 30 секунди и 72°C 45 секунди. *PCR* продукт ће потом бити пречишћен и секвенциран у аутоматским системима са реагенсом. Количина *PCR* продукта ће бити измерена на основу детекције и квантификације флуоресцентног сигнала.

За одређивање релативне количине протеина (*FLCN* протеина, фоликулина, *phospho s6* протеина) биће коришћен *Western-blot* метод. Телије ће бити припремљене у хладном раствору (25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂) који је непосредно пред употребу обогаћен инхибиторима протеазе (1 µg/ml апротинина, 2 mM *EDTA* и 1 mM фенил-метил-сулфонил флуорида (*PMSF*)). У моменту започињања лизирања ћелија (са лизирајућим пуфером у трајању од 10 минута) почињу и процеси као што су дефосфорилација, денатурација и протеолиза, који ће бити успорени држањем узорака

на леду. Након центрифугирања 10 минута на 13000 g на 4°C, у малим конусним епруветама ће се издвојити три слоја: горња водена фаза у којој се налазила РНК, интермедијарна фаза са ДНК, и доња фаза у којој су протеини и липиди. Доња, фенолна фаза ће бити пребачена у нове епрувете, а остатак ће бити одбачен. Након тога ће бити урађена преципитација протеина додавањем 600 µl ацетона по узорку, инкубација на собној температури у трајању од 10 минута и ново центрифугирање. Талог протеина ће бити опран 4 пута и помешан са стандардним пуфером за наливање на гел за електрофорезу (4x *Laemmli* пуфер: 1 M Tris-HCl pH 6.8, 20 % SDS, 0.2M β-меркаптоетанола, 0.004% бромфенол плавог, 20% глицерола). Након раздвајања електрофорезом на 12% или 15% SDS-полиакриламидном гелу, уследи ће трансфер на поливинил дифлуоридну мембрану. Неспецифично везивање антитела ће бити блокирано 1 сат на собној температури са 5% BSA у PBS-у са 0.1% *Tween-20*. Мембране ће преко ноћи бити инкубирани на 4°C са специфичним антителима раствореним у 1% BSA у PBS-у са 0.1% *Tween-20*. Потом ће уследити инкубација у трајању од 1 сат на собној температури са одговарајућим секундарним антителом коњугованим са пероксидазом. Везана антитела ће бити детектована хемилуминесценцијом, а количина протеина мерена дензитометријски употребом *Imagelab* софтвера.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле:

- примарна независна узрочна варијабла: присуство најзначајнијих мутација *FLCN*, у свих 14 кодирајућих егзона овог гена са посебним освртом на девети, једанаести и дванаести егзон

Зависне варијабле:

- примарне зависне исходишне варијабле: примарни спонтани пнеумоторакс верификован радиографским снимком плућа или *MSCT*-ом грудног коша
- секундарне зависне исходишне варијабле: концентracија фоликулина, концентracија *phospho s6*, прогностички индекси, време до рецидива болести, број рецидива

Збуњујуће варијабле:

- старост болесника
- животне навике – конзумирање цигарета

- телесна конституција
- позитивна породична анамнеза обољења

2.7.5. Снага студије

Величина узорка је израчуната на основу података о мутацији *FLCN* код пацијената са фамилијарним спонтаним пнеумотораксом, а ови подаци су добијени из студије *Xing H* и сарадника из 2017. године. Студијски узорак је израчунат узимајући да је $\alpha=0.05$, а снага студије $1-\beta=0.95$ (95%) за Т-тест, поредећи групе међу собом. Применом комерцијалног програма *G Power v.3.0.10* утврдили смо да је за дате критеријуме неопходан узорак од 55 пацијената са примарним спонтаним пнеумотораксом у испитиваној групи, као и 55 испитаника који ће чинити здрава популација у контролној групи.

2.7.6. Статистичка обрада података

За статистичку обраду података биће коришћен статистички програм *SPSS*, верзија 20. Пре статистичке обраде података, прво ће бити испитана нормалност расподеле добијених вредности. Уколико добијени резултати буду имали нормалну расподелу биће коришћен параметријски независни Т-тест, док ће у противном бити примењен непараметријски *Mann-Whitney* тест. Нормалност расподеле унутар групе биће анализирана *Kolmogorov-Smirnov* и *Shapiro-Wilk* тестовима. Вредност *p* мања од 0.05 ће се бити сматрана статистички значајном. Резултати ће бити приказани табеларно и графички.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Иако је значајан глобални проблем, тачан узрок и патогенеза примарног спонтаног пнеумоторакса су и даље непознати. Циљ ове студије је да утврди улогу мутације *FLCN* гена и последичних молекуларних промена код пацијената са примарним спонтаним пнеумотораксом.

Позитивни резултати истраживања могу да омогуће разумевање, до сада непознате, етиологије и патогенезе примарног спонтаног пнеумоторакса и укажу на нове модалитете лечења и омогуће лакше доношење одлуке о евентуалном оперативном лечењу ових пацијената.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Примарни спонтани пнеумоторакс, који је значајан глобални проблем, се јавља код здравих особа млађег животног доба које немају познатну плућну болест. Познато је да настаје услед руптуре субплеуралних блебса или була, а сама патогенеза настанка истих и њихове спонтане руптуре је и даље непозната. 24-38% пацијената са *Birt-Hogg-Dube* синдромом, у чијој је основи мутација *FLCN* гена, развије спонтани пнеумоторакс. Улога *FLCN* и фоликулина, протеина који овај ген кодира, је највише проучавана у склопу *Birt-Hogg-Dube* синдрома, али и даље није у потпуности дефинисана. Циљ ове студије је утврди директну везу између мутације *FLCN*, концентracије фоликулина и последичне активације *mTOR* сигналног пута и активности *phospho s6* протеина са настанком примарног спонтаног пнеумоторакса. Мутације *FLCN* ће бити детектоване методом ланчане реакције полимеразе (енгл. *polimerase chain reaction, PCR*). За одређивање релативне количине протеина (*FLCN* протеина, фоликулина, *phospho s6* протеина) биће коришћен *Western-blot* метод.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се доц. др Милош Арсенијевић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија. Предложени ментори испуњавају услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Доцент др Милош Арсенијевић

1. **Arsenijević M**, Milovanovic M, Volarevic V, Djeković A, Kanjevac T, Arsenijević N, Dukić S, Bugarcic ZD. Cytotoxicity of gold (III) complexes on A549 human lung carcinoma epithelial cell line. *Med Chem* 2012;8(1):2-8. M23
2. **Arsenijević M**, Milovanović M, Volarević V, Čanović D, Arsenijević N, Soldatović T, Jovanović S, Bugarčić ŽD. Cytotoxic properties of platinum (IV) and dinuclear platinum (II) complexes and their ligand substitution reactions with guanosine-5'-monophosphate. *Transition Met Chem.* 2012;37(5):481-8. M23

3. **Arsenijevic M**, Mitrovic S, Milosavljevic MZ, Petrovic M, Djurdjevic P, Milisavljevic S. A rare case of coexistent intralobar and extralobar pulmonary sequestration. Cent Eur J Med. 2013;8(1):103-6.
4. Milisavljevic S, Grujovic NN, Mrvic S, Stojkovic D, **Arsenijevic M**, Jeremic B. Sternum resection and chest wall reconstruction with metaacrilate implant in tuberculosis. Indian J Surg. 2013;75(Suppl 1):257-260. M23
5. Milošević B, Milisavljević S, Dončić N, **Arsenijević M**, Mrvić S, Stojković D, Marić N, Spasić M. Flail chest in a polytraumatized patient: Management and treatment - case report Vojnosanit Pregl. 2017;74(8):786–90. M23
6. Spasić M, **Arsenijević M**, Dončić N, Mrvić S, Stojković B, Milošević BZ, Milisavljević Z. A rare case of traumatic chylothorax after blunt thoracic trauma. Srp Arh Celok Lek. 2017;145(1-2):73-76 M23

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална хирургија

5. Научна област чланова комисије

1. проф. др Зорица Лазић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник;
2. проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, члан;
3. доц. др Иван Кухајда, доцент Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Хирургија, члан;

Закључак и предлог комисије

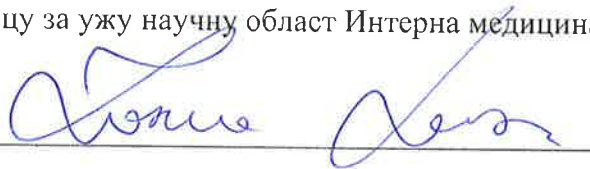
На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публикованих радова др Ане Луковић, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације

Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита утицај мутације егзона FLCN гена, концентрације фоликулина и *phospho-s6* протеина на настанак примарног спонтаног пнеумоторакса.

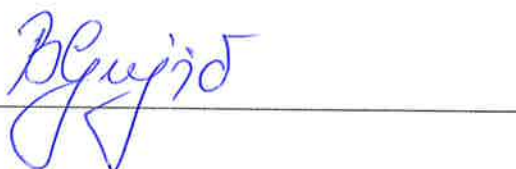
Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Ане Луковић под називом „ Утицај мутације егзона FLCN гена, концентрације фоликулина и *phospho-s6* протеина на настанак примарног спонтаног пнеумоторакса ” и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

проф. др Зорица Лазих, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник



проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука за ужу научну област Генетика, члан



доц. др Иван Кухајда, доцент Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Хирургија, члан



У Крагујевцу, октобар 2020. године