

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 11.03.2022. godine, broj 11/IV-3/3-MR, imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Ispitivanje biohemijskih i patohistoloških markera značajnih za prognozu karcinoma bubrežnih ćelija“**

kandidata dr Milana Radovanovića, zaposlenog u Klinici za urologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije. Mentor 1 je Prof. dr Zoran Džamić, a mentor 2 Prof. dr Sanja Radojević Škodrić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Aleksandra Isaković, redovni profesor, Institut za biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Tatjana Pekmezović, redovni profesor, Institut za epidemiologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Vladimir Bančević, vanredni profesor urologije, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, Komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nastavno-naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

## IZVEŠTAJ

### **A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije**

Doktorska disertacija dr Milana Radovanovića pod nazivom “Ispitivanje biohemijskih i patohistoloških markera značajnih za prognozu karcinoma bubrežnih ćelija” napisana je na ukupno 90 strana, uz poštovanje Uputstva o obliku i sadržaju doktorske disertacije koja se brani na Univerzitetu u Beogradu (Uputstvo objavio Univerzitet u Beogradu 2019. godine). Disertacija je podeljena na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode,

rezultati, diskusija, zaključci i literatura. Disertacija sadrži 12 slika, 12 grafikona i 17 tabela. Doktorska disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, izjavu zahvalnosti, biografiju kandidata, podatke o komisiji, te Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **uvodu** je temeljno sagledan problem karcinoma bubrežnih ćelija iz različitih aspekata, kroz razmatranje epidemiologije bolesti, njene etiologije, faktora rizika za njen nastanak, patohistoloških i citogenetskih karakteristika tumora, simptomatologije bolesti, savremene dijagnostike bolesti, stadijuma razvoja, toka i prognoze bolesti, kao i savremenih terapijskih postupaka. Posebna pažnja je obraćena do sada poznatim patoanatomskim, patohistološkim i biomolekularnim faktorima, kao i faktorima vezanim za samog pacijenta od značaja za tok i prognozu karcinoma bubrežnih ćelija.

**Ciljevi rada** su precizno definisani i taksativno navedeni. Najpre je potrebno analizirati ekspresiju proteina angiogeneze i proliferativnih markera u karcinomu bubrežnih ćelija i utvrditi stepen njihove međusobne korelacije. Potom je potrebno analizirati ekspresiju gena i proteina uključenih u proces apoptoze i autofagije u tumorskom i peritumorskom tkivu karcinoma bubrežnih ćelija. Na osnovu dobijenih rezultata o ekspresiji proteina angiogeneze i ekspresiji proliferativnih markera definisati kriterijume za precizniju klasifikaciju karcinoma bubrežnih ćelija. Proceniti značaj ekspresije pojedinih gena i proteina uključenih u kontrolu procesa apoptoze i autofagije za prognozu toka bolesti, odnosno preživljavanje kod karcinoma bubrežnih ćelija.

U poglavlju **materijal i metode** su precizno i jasno definisani svi postupci primenjeni u ispitivanju. Precizirana je ispitivana populacija kroz određivanje mesta i vremena provođenja ispitivanja i kriterijume za uključivanje, odnosno isključivanje pacijenata iz studije. Navedeni su i definisani posmatrani parametri kao i način njihovog prikupljanja. Određeni su kriterijumi za klasifikovanje pojedinačnih tumorskih lezija. Detaljno je definisana i opisana primenjena imunohistohemijska analiza prikupljenih uzoraka. Detaljno je opisan postupak određivanja nivoa ekspresije iRNK kojom je omogućena analiza ekspresije gena uključenih u kontrolu apoptoze i autofagije. Determnisane su metode deskriptivne i analitičke statistike primenjene u obradi prikupljenih podataka.

Naglašeno je da je Etički komitet Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu potvrdio da je istraživanje u skladu sa etičkim načelima Helsinške deklaracije i načelima Etičkog komiteta samog fakulteta.

U poglavlju **rezultati** detaljno, jasno i sistematično su predstavljeni i ilustrovani svi istraživanjem dobijeni rezultati.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

**Zaključci** sažeto i taksativno prikazuju najvažnije nalaze proistekle iz studije i odgovaraju na zadatke određene u cilju istraživanja.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 242 reference. Ističe se savremenost literature, koja adekvatno prati tekst disertacije.

## **B) Provera originalnosti doktorske disertacije**

Prema članu 9 Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18), izvršena je provera originalnosti doktorske disertacije pod nazivom „Ispitivanje biohemijskih i patohistoloških markera značajnih za prognozu karcinoma bubrežnih ćelija” dr Milana Radovanovića, korišćenjem programa iThenticate. Utvrđeno je da je procenat podudarnosti (Similarity index) 10%. U najvećoj meri, ovaj stepen podudarnosti je posledica podudaranja opšte terminologije ispitivanog problema, i korišćene metodologije. Analiza je utvrdila da nije bilo akademske nekorektnosti, ni u navođenju rezultata drugih istraživača, ni u navođenju rezultata sopstvenih istraživanja.

## **C) Kratak opis postignutih rezultata**

Veliki problem u terapijskom pristupu RCC jeste njegova rezistencija na hemioterapiju. Imajući u vidu da je angiogeneza ključan faktor koji doprinosi napredovanju svih tumora pa i RCC, kao i da apoptoza i autofagija mogu doprineti hemorezistenciji RCC smatrali smo značajnim upravo ispitivanje patohistoloških i biomolekulanih faktora kao potencijalnih markera RCC i prognostičkih faktora u odnosu na tok bolesti i njen ishod. Takođe, ispitivanjem angiogeneze, apoptoze i autofagije u različitim tipovima karcinoma bubrega bi se mogao poboljšati terapijski pristup, a samim tim i prognoza pacijenata obolelih od karcinoma bubrega, naročito onih sa metastatskom bolešću.

U okviru ovog istraživanja su izvedene dve studije na istom uzorku. Uzorak su činili pacijenti sa postavljenom dijagnozom RCC (90 pacijenata) i pacijenti sa ccRCC (30 pacijenata) koji su hirurški lečeni na Klinici za urologiju Kliničkog centra Srbije. Jedna studija je obuhvatila patohistološko ispitivanje ekspresije p53, VEGF, survivina i beta katenina u različitim podtipovima RCC (90 pacijenata) i njihovu međusobnu korelaciju kao i njihovu korelaciju sa stadijumom, gradusom i ishodom bolesti. Za potrebe ovog dela istraživanja je primenjena imunohistohemijska metoda primenom metode tkivnog mikroniza (engl. tissue microarray - TMA). Druga studija je obuhvatila ispitivanje ekspresije gena i proteina uključenih u kontrolu procesa apoptoze i autofagije u ccRCC kao najčešćem tipu RCC (30 pacijenata). Za potrebe ovog segmenta istraživanja primenjene su RT-qPCR metoda i imunoblot analiza.

Dobijeni rezultati su pokazali da je u tkivu RCC prisutna ekspresija p53, VEGF, survivina i beta katenina i da ekspresija ovih proliferativnih markera korelira pozitivno sa stadijumom i gradusom bolesti (izuzev beta katenina koji je pokazao negativnu korelaciju). Takođe je pokazano da između analiziranih markera nema međusobne korelacije. Istovremeno, ekspresija p53, VEGF i survivina pokazuje negativnu korelaciju sa dužim preživljavanjem dok ekspresija beta katenina pokazuje pozitivnu korelaciju. U tkivu ccRCC pokazana je povećana ekspresija iRNK za p21, p27, p53 tumor supresor gene, Bax i Bad antiapoptotskih gena dok je ekspresija tumor supresora PTEN bila viša u peritumorskom tkivu. Ekspresija iRNK za markere autofagije p62, Atg4 i Uvrag je bila viša u tumorskom tkivu ccRCC. Analizom ekspresije proteina uključenih u inicijaciju i kontrolu apoptoze i autofagije je pokazano da je transkripciona indukcija autofagije kod ccRCC udružena sa AMPK/mTORC1- nezavisnom ULK1 aktivacijom i povećanjem autofagnog fluksa ali ne i apoptozom. Pri tome je zaključeno da su indukcija autofagije i povišeni autofagni fluks, ali ne i apoptoza, udruženi sa nižim stadijumom bolesti, veličinom tumora i metastatskim potencijalom kao i dužim preživljavanjem pacijenata sa ccRCC.

#### **D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Karcinom bubrežnih ćelija (RCC) je veoma heterogena i složena bolest. Prognoza ovog stanja se trenutno procenjuje na osnovu histološkog podtipa bolesti, gradusa bolesti, stadijuma bolesti uz procenu statusa limfnih čvorova odnosno postojanja metastatskih promena. Smatra se da se klinički ishod RCC može poboljšati usmeravanjem terapije na molekularne mehanizme koji su odgovorni za rast i progresiju tumora u okviru individualnog pristupa pacijentu. Zbog toga je fokus ovog istraživanja bio usmeren na analizu ekspresije proteina angiogeneze i proliferativnih markera u karcinomu bubrežnih ćelija kao i analizu ekspresije gena i proteina uključenih u proces apoptoze i autofagije u peritumorskom i tumorskom tkivu karcinoma bubrežnih ćelija. Ovo je omogućilo definisanje kriterijuma za precizniju klasifikaciju karcinoma bubrežnih ćelija kao i procenu značaja ekspresije pojedinih gena i

proteina uključenih u kontrolu procesa apoptoze i autofagije za prognozu toka bolesti tj. preživljavanje.

Značaj molekularnih markera je višestruk. Oni mogu da se koriste za skrining, dijagnozu ili praćenje RCC. Medjutim za sada nema dovoljno podataka kojima bi mogla da se dokaže njihova opravdana rutinska klinička primena. Postoji nekoliko molekularnih markera za koje je, do sada, pokazan potencijalni prognostički značaj, kao što su Von-Hippel- Lindau (VHL), hipoksija-inducibilnog faktora (HIF) i faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF). Poznato je da je angiogeneza važan faktor za razvoj malignih tumora i njihovu progresiju. Nasledni i sporadični RCC se karakterišu inaktivacijom VHL gena, što rezultuje hiperaktivnošću HIF1 $\alpha$ . Kao posledica toga, dolazi do proizvodnje angiogenih faktora, kao što su VEGF i trombocitni faktor rasta (PDGF). Pokazano je da je ekspresija ovih faktora povezana sa tumorogenezom, rastom i metastatskim potencijalom karcinoma bubrežnih ćelija. Pored VEGF, kao poznatog prognostičkog markera RCC, ovo istraživanje je obuhvatilo i ispitivanje ekspresije i survivina, p53 i beta katenina kao prognostičkih markera RCC. U dostupnoj literaturi podaci o ekspresiji ovih patohistoloških markera u odnosu na histološki tip i stadijum bolesti RCC su nekonzistentni. Ovo istraživanje je pokazalo pozitivnu ekspresiju svih analiziranih markera (p53, VEGF, survivina i beta katenina) u tkivu RCC i to tako da ekspresija ovih proliferativnih markera pozitivno korelira sa stadijumom i gradusom bolesti osim u slučaju beta katenina koji je pokazao negativnu korelaciju. Takođe je značajno da između analiziranih markera nije pokazana međusobna korelacija. Analizirajući značaj pomenutih molekularnih patohistoloških markera u prognozi ishoda RCC pokazano je da ekspresija p53, VEGF i survivina pozitivno korelira sa dužim preživljavanjem dok ekspresija beta katenina pokazuje negativnu korelaciju.

Pored patohistoloških markera, analizirani su i biomolekularni markeri imajući u vidu da je ključni problem u terapijskom pristupu RCC njegova rezistencija na hemioterapeutike koji indukuju apoptozu (programirana ćelijska smrt tip I). Zbog toga su, pored genskih i proteinskih markera apoptoze, ispitivani i genski i proteinski markeri autofagije kao alternativnog vida ćelijske smrti čijom bi se aktivacijom mogla prevazići rezistencija RCC na apoptozu. Ovakvi alternativni terapijski modaliteti koji obuhvataju inhibiciju proliferacije tumorskih ćelija posredstvom autofagije i/ili izazivanje autofagijske ćelijske smrti su već uočeni kod mnogih drugih tipova tumorskih ćelija. Pored toga, pokazana povišena ekspresija

iRNK anti-apoptotskog BCLXL gena uz odsustvo povećane aktivacije PARP u ovom istraživanju potvrđuje i dokazuje ograničenje apoptoze u tkivu ccRCC.

U cilju ispitivanja aktivacionog statusa apoptoze u ccRCC, ispitivana je ekspresija iRNK u tumorskom ccRCC i peritumorskom tkivu za šest članova BCL2 familije regulatora apoptoze (BAX, BAD, BAK1, BCL2, Bim, i BCL-xL), četiri tumor supresor gena (CDKN1A, CDKN1B, PTEN, TP53), inhibitor apoptoze XIAP i aktivator apoptoze PMAIP1. U tkivu ccRCC je pokazana povećana ekspresija iRNK za p21, p27, p53 tumor supresor gene. Maligni potencijal povišene ekspresije p21 i p27 nije jasan, uzimajući u obzir njihovu ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa. Međutim, pokazano je da povećana ekspresija p21 i p27 upravo može da promoviše nastanak tumora što se pripisuje njihovoj onkogenoj aktivnosti. Iako je u ovoj studiji pokazana povećana ekspresija iRNK za antiapoptotske gene Bax i Bad, za razliku od drugih studija, nije pokazana njihova povezanost sa gradusom tumora. Sa druge strane, ekspresija tumor supresora PTEN bila je viša u peritumorskom tkivu. Ovaj rezultat je u skladu sa literaturnim podacima obzirom da su imunohistohemijske studije pokazale da tokom karcinogeneze ccRCC dolazi do skoro potpunog gubitka ekspresije PTEN i da je ovo rani događaj u karcinogenezi ovog tumora kao i da gubitak ekspresije PTEN ukazuje na lošiji odgovor na hemoterapiju.

Analizirajući značaj aktivacionog statusa autofagije u ccRCC pokazano je da je u tkivu ccRCC povećana ekspresija iRNK za markere autofagije p62, Atg4 i Uvrags. Literaturni podaci o iRNK ukazuju na transkripcionu indukciju autofagije kod ccRCC, međutim promenljivost rezultata dobijenih u pogledu proteinskih nivoa onemogućava izvodjenje zaključaka o opštem statusu autofagije kod ovog tipa bubrenih maligniteta. Zbog toga je ova studija obuhvatila i ispitivanje aktivacionog statusa apoptoze i autofagije na nivou ekspresije proteina. Tako je analizom ekspresije proteina uključenih u inicijaciju i kontrolu apoptoze i autofagije pokazano da je transkripciona indukcija autofagije kod ccRCC udružena sa AMPK/mTORC1-nezavisnom ULK1 aktivacijom i povećanjem autofagnog fluksa ali ne i apoptozom. Ovi rezultati se nadovezuju i dopunjuju prethodna istraživanja i saznanja o regulaciji autofagije u ccRCC.

Razmatrajući značaj pomenutih biomolekularnih markera u prognozi ishoda ccRCC ustanovljeno je da su indukcija autofagije i povišeni autofagni fluks, ali ne i apoptoza,

udruženi sa nižim stadijumom bolesti, veličinom tumora i metastatskim potencijalom. Takođe je zanimljiv rezultat koji pokazuje da su indukcija autofagije i povišeni autofagni fluks, ali ne i apoptoza udruženi sa dužim preživljavanjem pacijenata sa ccRCC.

Izuzetan je objektivni osvrt kandidata na slabost ovog istraživanja koja se odnosi na relativno mali broj uzoraka. Pri tome su razlozi jasno navedeni i obrazloženi.

Dobijeni rezultati ovog istraživanja su obećavajući i otvaraju mogućnosti za dalja istraživanja u ovoj oblasti. Pri tome će, svakako, biti neophodne dodatne studije sa većim brojem uzoraka, kako bi se bolje opisala uloga, kao i prognostički i terapijski značaj patohistoloških i biomolekularnih markera u RCC.

#### **E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

- 1. Radovanovic M**, Vidicevic S, Tasic J, Tomonjic N, Stanojevic Z, Nikic P, Vuksanovic A, Dzamic Z, Bumbasirevic U, Isakovic A, Trajkovic V. Role of AMPK/mTOR-independent autophagy in clear cell renal cell carcinoma. *J Investig Med*. 2020 Dec; 68(8):1386-1393. doi: 10.1136/jim-2020-001524. Epub 2020 Oct 21.
- 2. Radovanovic M**, Dzamic Z. Autophagy and renal cell carcinoma: What do we know so far? *MedPodml* 2021, 72(1): 43-49. doi:10.5937/mp72-31557

#### **F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „Ispitivanje biohemijskih i patohistoloških markera značajnih za prognozu karcinoma bubrežnih ćelija“ dr Milana Radovanovića, obrađuje jednu izuzetno važnu, aktuelnu, a još uvek nedovoljno istraženu temu, jednim celovitim, inovativnim i multidisciplinarnim pristupom.

Istraživanje je pravilno metodološki postavljeno i sprovedeno prema svim principima naučnog istraživanja. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i upotpunjeni jasnim i informativnim priložima. Diskusija je bogata, sistematična i ne prikazuje samo poređenje sa rezultatima do sada sprovedenih studija, već pruža moguća objašnjenja i osvetljava pun značaj dobijenih rezultata u ovom istraživanju. Zaključci izvedeni iz rezultata su precizno i taksativno navedeni i pružaju jasne odgovore na prethodno postavljene ciljeve istraživanja.

Rezultati studije imaju veliki praktični značaj jer pomažu u prepoznavanju i definisanju parametara od značaja za prognozu karcinoma bubrežnih ćelija. Pored toga studija daje smernice za dalje istraživanje problema karcinoma bubrežnih ćelija.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji bogati rad kandidata, komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Milana Radovanovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, .03.2022. godine

Članovi Komisije:

Prof. dr Aleksandra Isaković

---

Prof. dr Tatjana Pekmezović

---

Prof. dr Vladimir Bančević

---

Mentori:

Prof. dr Zoran Džamić

---

Prof. dr Sanja Radojević Škodrić

---