

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Danilo D. Obradović

ANALIZA EKSPRESIJE ANTIANGIOGENOG
FKBPL PROTEINA, VASKULARNOG
ENDOTELNOG FAKTORA RASTA I
ESTROGENOG RECEPTORA U
ENDOMETRIOIDNOM KARCINOMU UTERUSA
I BENIGNOJ HIPERPLAZIJI ENDOMETRIJUMA

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Danilo D. Obradović

ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF
ANTIANGIOGENIC FKBPL PROTEIN,
VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR
AND ESTROGEN RECEPTOR IN UTERINE
ENDOMETRIOID CARCINOMA AND BENIGN
ENDOMETRIAL HYPERPLASIA

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

Mentori:

Prof. dr Dejan Opić, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Lana McClements University of Tachnology, Sydney, Australia

Članovi komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije:

1. Prof. dr Svetislav Tatić, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

2. Prof. dr Sofija Glumac, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

3. Prof. dr Biserka Vukomanović, Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane

Datum odbrane:

ANALIZA EKSPRESIJE ANTIANGIOGENOG FKBPL PROTEINA, VASKULARNOG ENDOTELNOG FAKTORA RASTA I ESTROGENOG RECEPTORA U ENDOMETRIOIDNOM KARCINOMU UTERUSA I BENIGNOJ HIPERPLAZIJI ENDOMETRIJUMA

Sažetak

Uvod: FKBPL (*FK506-binding protein-like*), pripada familiji imunofilina, FK506 vezujućih proteina, i predstavlja aktuelno široko ispitivani negativni regulator rasta tumora, angiogeneze i metastaza, sa perspektivom u razvoju ciljane onkološke terapije. Viši nivo ekspresije FKBPL kod pacijenata sa karcinomom dojke je dokazan kao nezavisni prognostički faktor dužeg preživljavanja, kao i dužeg intervala bez relapsa u grupi sa visokom ekspresijom estrogenog receptora, dok je niži nivo ekspresije FKBPL povezan sa lošijom prognozom preživljavanja. Pokazano je da je povećana ekspresija FKBPL kod pacijenata sa karcinomom dojke praćena nižom ekspresijom estrogenog receptora (ER), većom zavisnošću rasta tumora od estrogene stimulacije i većom senzitivnošću tumora na endokrinu terapiju Tamoksifenom. U okviru predkliničkih studija dokazano je inhibitorno dejstvo FKBPL i njegovih derivata na rast kancerskih stem ćelija karcinoma dojke. Ekspresija FKBPL takođe je ispitivana na kulturama kancerskih stem ćelija karcinoma ovarijuma i ciljana terapija bazirana na FKBPL je pokazala antiangiogeno dejstvo kojim dovodi do usporavanja rasta kolonija stem ćelija karcinoma ovarijuma posredstvom inhibicije migracije endotelних ćelija. Dokazana je genska ekspresija FKBPL u stromi karcinoma endometrijuma, dok su trenutno jedini izvor o imunohistochemijskoj ekspresiji FKBPL u endometrijumu i karcinomu endometrijuma enciklopedijske baze podataka. Prema dostupnim i relevantnim izvorima, do sada nije izvedena analiza značaja nivoa ekspresije antiangiogenog FKBPL proteina u karcinomima endometrijuma, sa detaljnim sagledavanjem ključnih prognostičkih parametara.

Ciljevi: Ciljevi ovog istraživanja su bili da se ispita nivo ekspresije FKBPL, VEGF-A i ER, kao i pojedinačna povezanost nivoa ekspresije VEGF-A i ER sa nivoom ekspresije FKBPL, u endometrioidnom karcinomu i benignoj hiperplaziji endometrijuma; da se ispita povezanost nivoa ekspresije FKBPL sa prosečnom gustinom krvnih sudova u endometrioidnom karcinomu i benignoj hiperplaziji endometrijuma; i da se ispita povezanost nivoa ekspresije FKBPL u endometrioidnom karcinomu endometrijuma sa dubinom invazije miometrijuma, prisustvom limfovaskularne invazije, histološkim gradusom tumora i kliničkim stadijumom bolesti.

Metode: Studijsku populaciju je činilo 90 slučajeva endometrioidnog karcinoma i 40 slučajeva benigne hiperplazije endometrijuma. Kalupi su izdvojeni iz arhive službe za patologiju a klinički i histološki podaci su dobijeni uvidom u dokumentaciju pacijenata u Kliničko - bolničkom centru Zemun. Imunohistochemijska bojenja na FKBPL, VEGF-A, ER α i CD34 su urađena, prema uputstvima proizvođača, u laboratoriji Instituta za patologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu. Intenziteti ekspresije FKBPL i VEGF-A su izvedena dvostruko slepom analizom od strane dva patologa, kao i morfometrijskom metodom određivanja procenta površine žlezdanog tkiva sa pozitivnom reakcijom antitela. Nivo ER α je određen u okviru dvostruko slepe analize određivanjem intenziteta skalom 0 - 3, procentualne zastupljenosti ER α pozitivnih epitelnih ćelija skalom 0 - 5 i Allered-ovim skorom koji je suma vrednosti prethodne dve skale i u rasponu je 0 - 8. Krvni sudovi obeleženi antitelom CD34 su analizirani određivanjem vaskularne gustine morfometrijskom metodom, na delu uzorka. Morfometrijska merenja su rađena softverom za analizu slike *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*.

Rezultati: Intenzitet ekspresije FKBPL je pokazao statistički značajno ($p < 0.001$) niže vrednosti u endometrioidnom karcinomu nego u benignoj hiperplaziji endometrijuma, umerenu pozitivnu korelaciju ($p < 0.05$) sa sva tri parametra ekspresije ER α , i umerenu negativnu korelaciju ($p < 0.05$) sa nivoom ekspresije VEGF-A na nivou celog uzorka. Nije pronađena značajna povezanost nivoa ekspresije FKBPL sa prognostičkim parametrima karcinoma endometrijuma, dubinom invazije

miometrijuma, prisustvom limfovaskularne invazije, gradusom i stadijumom što se delom može objasniti limitacijom studije zbog relativno biološki uniformnog uzorka karcinoma endometrijuma, sličnim gradusima i stadijumima. Morfometrijska metoda analize FKBPL i VEGF-A nije prošla fazu validacije i naš zaključak je da određivanje procenta površine pozitivne reakcije u žlezdama nije adekvatan metod u odnosu na karakteristike imunohistohemijske reakcije ovih antitela, kao i da se semikvantitativna dvostruko slepa analiza pokazala kao metoda uzgora, koja je pokazala visok stepen unutrašnjeg slaganja. Svi parametri nivoa ekspresije ER α su pokazali značajno veći intenzitet ($p < 0.001$) u tkivu hiperplazija u odnosu na karcinome endometrijuma. Nivo ekspresije VEGF-A je bio značajno viši ($p < 0.001$) u tkivu karcinoma u odnosu na tkivo hiperplazija, dok je u grupi karcinoma intenzitet ekspresije VEGF-A bio značajno povezan sa gradusom tumora ($p < 0.05$). Vaskularna gustina je bila značajno veća ($p < 0.001$) u uzorcima karcinoma u odnosu na tkivo hiperplazija. Intenzitet ekspresije FKBPL je pokazao značajnu negativnu korelaciju sa nivoom vaskularne gustine ($p < 0.001$).

Zaključak: Prema našim saznanjima, predstavljamo prvu sveobuhvatnu studiju o imunohistohemijskoj ekspresiji FKBPL u endometrioidnom karcinomu endometrijuma, koja pokazuje značajno smanjenje intenziteta ekspresije FKBPL u poređenju sa tkivoma benigne hiperplazije endometrijuma sa visokom prediktivnom vrednošću u malignih promena. Studija daje uvid u korelaciju ekspresije FKBPL i ER α kao poznatog faktora proliferacije endometrijuma i VEGF-A kao jednog od centralnih pro-angiogenih faktora i ciljnih proteina za antiangiogenu terapiju karcinoma endometrijuma.

Ključne reči: endometrioidni karcinom endometrijuma; angiogeneza; FKBPL (FK506 - *binding protein - like*); vaskularni endotelni faktor rasta - A, estrogeni receptor alfa; vaskularna gustina.

Naučna oblast: medicinske nauke

Uža naučna oblast: biologija tumora

UDK broj:

ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF ANTIANGIOGENIC FKBPL PROTEIN, VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND ESTROGEN RECEPTOR IN UTERINE ENDOMETRIOID CARCINOMA AND BENIGN ENDOMETRIAL HYPERPLASIA

Abstract

Background: FKBPL (FK506 binding protein-like), is a divergent member of the immunophilin family, FK506 binding proteins, and is currently a widely studied negative regulator of tumor growth, angiogenesis, and metastasis, with a perspective in the development of targeted therapy in gynecological oncology. A higher level of FKBPL expression in breast cancer patients has been proven to be an independent prognostic factor of longer survival, as well as a longer relapse-free interval in the group with high estrogen receptor expression, while a lower level of FKBPL expression is associated with a worse survival prognosis. It has been shown that increased expression of FKBPL in patients with breast cancer is accompanied by lower expression of ER, greater dependence of tumor growth on estrogen stimulation, and greater sensitivity of tumors to endocrine therapy. In the framework of preclinical studies, the inhibitory effect of FKBPL and its derivatives on the growth of breast cancer stem cells has been proven. The expression of FKBPL was also examined on the cultures of ovarian cancer stem cells and the targeted therapy based on FKBPL showed an antiangiogenic effect, which leads to the slower growth of ovarian cancer stem cell colonies, by inhibiting the migration of endothelial cells. The gene expression of FKBPL in the stroma of endometrial carcinoma has been proven, while currently, the only available source on the immunohistochemical expression of FKBPL in the endometrium and endometrial carcinoma is the encyclopedic human protein database. According to available and relevant sources, there are no publications offering a comprehensive analysis on the subject of expression of the anti-angiogenic FKBPL protein in endometrial cancers has been performed, with a detailed review of the key prognostic parameters.

Objectives: The objectives of this study were to examine the expression level of FKBPL, VEGF-A, and ER, as well as the individual association of the expression level of VEGF-A and ER with the expression level of FKBPL, in endometrioid carcinoma and benign endometrial hyperplasia; to examine the association of FKBPL expression levels with vascular density in endometrioid carcinoma and benign endometrial hyperplasia; and to explore the association of FKBPL expression levels in endometrioid endometrial carcinoma with the depth of myometrial invasion, presence of lymphovascular invasion, histological tumor grade and clinical stage of the disease.

Methods: The study population consisted of 90 cases of endometrioid carcinoma and 40 cases of benign endometrial hyperplasia. Paraffin molds were obtained from the archives of the pathology service, and clinical and histological data were obtained from patient documentation at the Zemun Clinical Hospital Center. Immunohistochemical stainings for FKBPL, VEGF-A, ER α , and CD34 were performed, according to the manufacturer's instructions, in the laboratory of the Institute of Pathology, Faculty of Medicine in Belgrade. Expression intensities of FKBPL and VEGF-A were performed by double-blind analysis by two pathologists, as well as by the morphometric method of determining the percentage of the glandular tissue surface with a positive antibody reaction. The level of ER α was determined in a double-blind analysis by determining the intensity on a scale of 0-3, the percentage of ER α -positive epithelial cells on a scale of 0-5, and Allered's score, which is the sum of the values of the previous two scales and is in the range of 0-8. Blood vessels labeled with the CD34 antibody were analyzed by determining the vascular density using the morphometric method, on part of the sample. All morphometric measurements were made with Fiji image analysis software: an open-source platform for biological-image analysis.

Results: FKBPL expression intensity showed statistically significantly ($p < 0.001$) lower values in endometrioid carcinoma than in benign endometrial hyperplasia, moderate positive correlation ($p < 0.05$) with all three parameters of ER α expression, and moderate negative correlation ($p < 0.05$)

with the level of VEGF-A expression observed analyzing the whole sample. No significant association of FKBPL expression level with prognostic parameters of endometrial cancer, depth of myometrial invasion, presence of lymphovascular invasion, grade, and stage was found, which can partly be explained by the limitation of the study due to a relatively biologically uniform sample of endometrial cancer, with similar grades and stages. The morphometric method of FKBPL and VEGF-A analysis did not pass the validation stage, and our conclusion is that determining the percentage of the surface of the positive reaction in the endometrial glands is not an adequate method in relation to the characteristics of the immunohistochemical reaction and distribution of these antibodies, as well as that the semiquantitative double-blind analysis proved to be a method of choice, which showed a high degree of internal consistency. All parameters of ER α expression level showed a significantly higher intensity in hyperplasia tissue compared to endometrial carcinomas ($p < 0.001$). The level of VEGF expression was significantly higher ($p < 0.001$) in cancer tissue compared to hyperplasia tissue, while in the cancer group, the intensity of VEGF-A expression was significantly associated with tumor grade ($p < 0.05$). Vascular density was significantly higher in cancer samples compared to hyperplasia tissue ($p < 0.001$). The intensity of FKBPL expression showed a significant negative correlation with the level of vascular density ($p < 0.001$).

Conclusions: To our knowledge, we present the first comprehensive study on the immunohistochemical expression of FKBPL in endometrioid endometrial carcinoma, which shows a significant decrease in the intensity of FKBPL expression compared to benign endometrial hyperplasia tissues with a high predictive value in malignant changes. The study provides insight into the correlation of the expression of FKBPL and ER α as a known endometrial proliferation factor and VEGF-A as one of the central pro-angiogenic factors and target proteins for antiangiogenic therapy of endometrial cancer.

Key words: endometrioid endometrial carcinoma; angiogenesis; FKBPL (FK506-binding protein-like); vascular endothelial growth factor -A; estrogen receptor alpha; vascular density

Scientific field: medicine

Scientific subfield: tumor biology

UDK number:

SADRŽAJ

1. UVOD

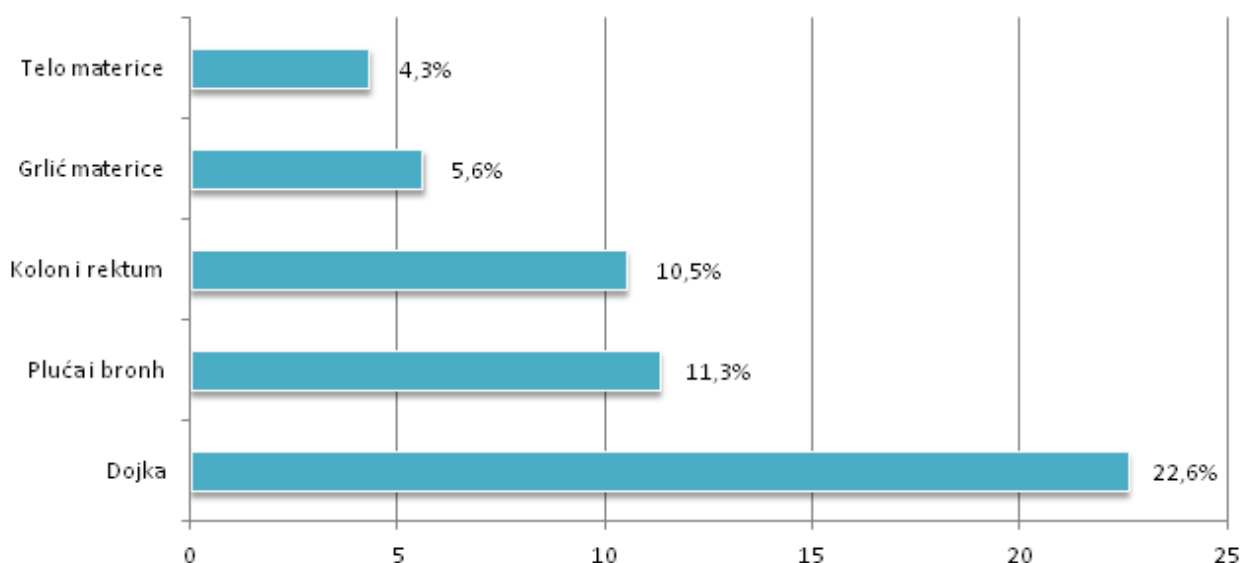
1.1. Epidemiologija karcinoma endometrijuma	1
1.2. Faktori rizika za razvoj karcinoma endometrijuma	2
1.3. Klasifikacija karcinoma endometrijuma	3
1.3.1. Histološka klasifikacija karcinoma endometrijuma	3
1.3.2. Molekularna klasifikacija karcinoma endometrijuma	3
1.3.3. Određivanje gradusa endometrioidnog karcinoma endometrijuma	4
1.3.4. Određivanje stadijuma karcinoma endometrijuma	6
1.3.5. Prekancerozne i hiperplastične promene endometrijuma	10
1.4. Angiogeneza	12
1.5. Vaskularni endotelni faktor rasta	12
1.6. Estrogeni receptor	14
1.7. FKBPL	17
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	21
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1. Uzorak	22
3.2. Imunohistohemijska bojenja	22
3.3. Histopatološka evaluacija	23
3.4. Statistička analiza	24
4. REZULTATI	25
4.1. Studijska populacija	25
4.2. Analiza stepena unutrašnjeg slaganja dvostruko slepog analiziranja	28
4.3. Ekspresija FKBPL u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma	30
4.3.1. Razlika ekspresije FKBPL u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma	30
4.3.2. Analiza dijagnostičke tačnosti ekspresije FKBPL	32
4.3.3. Korelacija ekspresije FKBPL sa analiziranim prognostičkim faktorima	35
4.3.3.1. Korelacija ekspresije FKBPL sa tumorskim gradusom	35
4.3.3.2. Korelacija ekspresije FKBPL sa stadijumom bolesti	36

4.3.3.3. Korelacija ekspresije FKBPL sa dubinom invazije miometrijuma	39
4.3.3.4. Korelacija ekspresije FKBPL sa prisustvom limfovaskularne invazije	40
4.3.4. Validacija metode za morfometrijsku analizu ekspresije FKBPL	42
4.4. Ekspresija ER α u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma	43
4.4.1. Intenzitet ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma	43
4.4.2. Procentualna zastupljenost ER α pozitivnih ćelija endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma	44
4.4.3. Nivo ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma određen Allred-ovim skorom	46
4.4.4. Korelacija ekspresije FKBPL i ER α	50
4.4.5. Korelacija ekspresije ER α sa tumorskim gradusom	53
4.5. Ekspresija VEGF-A u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma	57
4.5.1. Razlika ekspresije VEGF-A u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma	57
4.5.2. Korelacija ekspresije FKBPL i VEGF-A	61
4.5.3. Korelacija ekspresije VEGF-A sa tumorskim gradusom	62
4.5.4. Validacija metode za morfometrijsku analizu ekspresije VEGF-A	64
4.6. Vaskularna gustina u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma	65
4.6.1. Razlika vaskularne gustine u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma	65
4.6.2. Korelacija ekspresije FKBPL i vaskularne gustine	67
5. DISKUSIJA	70
6. ZAKLJUČCI	
7. LITERATURA	

1. UVOD

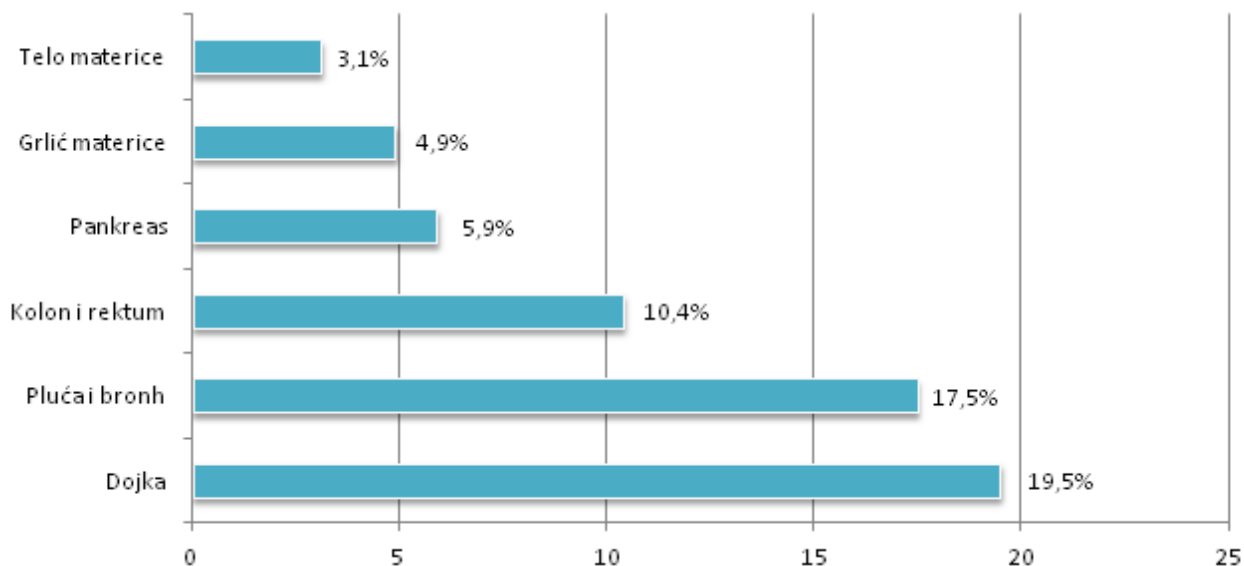
1.1. Epidemiologija karcinoma endometrijuma

Karcinomi endometrijuma (eng. *endometrial carcinoma*, EC) predstavljaju najčešće maligne tumore ženskog reproduktivnog sistema, i šesti su po učestalosti javljanja u ženskoj populaciji. Učestalost pojave EC je najveća u populaciji ženskih osoba u perimenopauzalnom, menopauzalnom i postmenopauzalnom dobu, sa najvišom incidencijom između 55. i 64. godine života. Kumulativni rizik od oboljevanja od EC je 3%. Iako učestaliji u navedenom životnom dobu, procenjeno je da je približno 20% žena dijagnostikovano pre nastupanja menopauze, a oko 5% žena pre 40. godine života, čineći grupu pacijentkinja heterogenom i stvarajući varijacije u terapijskim ciljevima. Prema izveštajima Američkog udruženja za borbu protiv raka (eng. *American Cancer Society*) procenjuje se da će u populaciji Sjedinjenih Američkih Država (SAD) godišnje biti dijagnostikovano 66570 slučajeva, a da će godišnje, usled ove bolesti, preminuti 12940 žena. Incidencija oboljevanja je, od perioda 2000 - tih godina, u porastu za oko 1% godišnje, dok je mortalitet, koji je bio u dvodecenijskom padu 1990 - ih godina, od 2009. do 2018. pokazao porast od oko 2% godišnje (American Cancer Society, 2021). Prema izveštajuma Instituta za javno zdravlje "Dr Milan Jovanović Batut" za 2020. godinu tumori tela materice su na petom mestu prema stopi oboljevanja u ženskoj populaciji Republike Srbije čineći 4.3% svih novobolelih žena od malignih bolesti. Veća učestalost je prijavljena za grupe obolelih od karcinoma dojke u 22.6%, karcinoma pluća i bronha u 11.3%, karcinoma kolona i rektuma sa 10.5% i karcinoma grlića materice sa 5.6% od svih slučajeva novobolelih od malignih blesti (Slika 1).



Slika 1. Lokalizacije malignih tumora prema učestalosti oboljevanja u ženskoj populaciji u Republici Srbiji za 2020. godinu.

Prema istom izvoru maligni tumori tela materice predstavljaju sedmi po učestalosti uzrok umiranja među ženama obolelih od malignih bolesti sa 3.1%. Veća učestalost smrtnih ishoda je prijavljena za grupe obolelih od karcinoma dojke u 19.5%, karcinoma pluća i bronha u 17.5%, karcinoma kolona i rektuma sa 10.4%, karcinoma pankreasa sa 5.9% i karcinoma grlića materice sa 4.9% od svih slučajeva preminulih od malignih blesti (Institut za javno zdravlje Srbije, 2022) (Slika 2).



Slika 2. Lokalizacije malignih tumora prema učestalosti smrtnih ishoda u ženskoj populaciji u Republici Srbiji za 2020. godinu.

Povećanje globalne incidence od 132% tokom prethodne tri decenije se dovodi u vezu sa povećanom učestalošću faktora rizika za nastanak EC. Pored povećanja prosečne starosti populacije, i pratećeg kumulativnog efekta na stopu oboljevanja, kao najznačajniji faktor rizika se navodi povećanje broja gojaznih osoba u svetskoj populaciji. Najviše vrednosti stopa oboljevanja su uočene na severnoameričkom kontinentu (86.6 / 100 000), istočnoevropskim zemljama (52.5 / 100 000), kao i zemljama centralne Evrope (21.9 / 100 000). Povećanje incidencije je primećeno u svim starosnim grupama, a u navedenom periodu broj pacijentkinja godišnje dijagnostikovanih sa EC pre 40-te godine je dvostruko povećan. Ova grupa pacijentkinja čini 4% dijagnostikovanih karcinoma endometrijskoga niskog stepena. Najveći porast incidencije je primećen u zemljama sa višim prosečnim prihodima stanovništva, dok je u ovim zemljama, tokom navedenog vremenskog perioda, opaženo 15% - no smanjenje stope mortaliteta. Nasuprot ovim nalazima primećena je značajno viša stopa mortaliteta u grupi pacijentkinja sa niskim i srednjim prihodima. Ova značajna negativna korelacija odnosa stope oboljevanja i umiranja sa socioekonomskim statusom se povezuje sa nedostupnošću kvalitetne medicinske nege i rane dijagnostike, kao i sa činjenicom da je u ovoj grupi žena učestalost agresivnijih tipova EC bila viša (Crosbie , 2022).

1.2. Faktori rizika za razvoj karcinoma endometrijskoga

Ključni faktori rizika za nastanak EC predstavljaju: visoka izloženost estrogenima, endogenog ili egzogenog porekla (bez oponiranog progesteronskog dejstva), visok indeks telesne mase, fizička neaktivnost, rana menarha (pre 12 godine života), kasna menopauza (nakon 55 godine života), infertilitet, nuliparnost, sindrom policističnih jajnika (eng. *polycystic ovary syndrome*, PCOS), Linčov sindrom, kao i upotreba leka Tamoksifena, selektivnog estrogenog modulatora, koji se primenjuje u grupi pacijentkinja sa karcinomom dojke. Jedna od prekretnica u razumevanju patogeneze EC su podaci o uticaju jake estrogenne stimulacije neoponirane dejstvom progesterona. Ovakav zaključak je proistekao iz studija gde je uočeno značajno povećanje učestalosti javljanja EC kod žena koje su primale hormonsku supstitucionu terapiju (HST) koja je sadržala samo estrogene, dok je u populaciji žena koje su koristile preparate koji su sadržali estrogene i progestine, ova pojava izostala. U istraživanju sprovedenom na grupi od 716738 ispitanica u postmenopauzalnoj

dobi, analizirana je razlika između grupe žena koje nisu koristile HST, i žena koje su koristile četiri različita terapijska protokola HST. Prva grupa je koristila samo estrogene preparate. Druga grupa je koristila estrogene sa kontinuiranim dodavanjem progestina. Treća grupa je koristila estrogene sa periodičnim dodavanjem progestina. Četvrta grupa je koristila Tibolon, sintetski steroidni preparat, niskog nivoa estrogena, progesteronske i androgene aktivnosti. Poredeći sa ženama koje nisu koristile HST, ova studija je pokazala značajan porast incidencije EC ($p < 0.04$) u grupi koja je koristila samo estrogene, kao i u grupi koja je koristila Tibolon ($p < 0.0001$), značajan pad incidencije ($p = 0.005$) u grupi koja je koristila estrogene sa kontinuiranim dodavanjem progestina, a u grupi koja je koristila estrogene sa periodičnim dodavanjem progestina nije uočena razlika u oboljevanju od EC. Interesantan nalaz je prijavljen u vidu razlike efekata ovih preparata između grupe osoba sa visokim i regularnim ili niskim BMI. Naime, neželjeni efekti estrogene HST i Tibolona su bili najizraženiji u grupi ispitanica sa niskim i regularnim BMI, a protektivni efekat kombinovane HST je bio najizraženiji u grupi gojaznih ispitanica (Beral, 2005). Pored opsežnih studija koje su pružile širok spektar informacija na ovu temu, uloga estrogena, iako očigledna i centralna ostaje kontroverzna usled opažanja da se EC javljaju najčešće u periodu pred, tokom i nakon menopauze, kada je dokazana niža koncentracija cirkulišućih estrogena. Ova pojava se naziva "paradoks endometrijuma" i predstavlja nepotpuno rasvetljenu dilemu o nastanku i razvoju EC i ulozi estrogena u navedenom procesu (Miyamoto, 2019). Povećanje indeksa telesne mase (eng. *body mass index*, BMI) je jedan od centralnih faktora rizika za razvijanje EC. Pokazano je da pacijentkinje sa vrednostima BMI većim od 40 kg/m^2 imaju 20 puta veću verovatnoću oboljevanja od EC u odnosu na grupu pacijentkinja sa BMI vrednostima između $18.5 - 25 \text{ kg/m}^2$. Ovaj porast je ekvivalentan riziku od oboljevanja od karcinoma pluća u grupi pacijenata sa istorijom dugogodišnje upotrebe duvana. Najčešći rani simptom EC su uterino krvarenje u postmenopauzalnom dobu i abnormalno uterino krvarenje u reproduktivnom periodu. Dijagnoza se postavlja patohistološkim pregledom kiretmana kavuma uterusa. Uobičajena terapija je hiruška (histerektomija), radioterapija i hemoterapija, o čemu će biti reči u daljem tekstu (American Cancer Society, 2021; Herrington, 2020).

1.3. Klasifikacija karcinoma endometrijuma

1.3.1. Histološka klasifikacija karcinoma endometrijuma

Histološki tipovi EC su: endometrioidni, serozni, svetloćelijski, nediferentovani, dediferentovani, mešoviti karcinom, mezonefrički, karcinom skvamoznih ćelija bez dalje mogućnosti određenja, mucinozni karcinom - intestinalni tip, karcinom nalik mezonefričkom karcinomu i karcinosarkom bez dalje mogućnosti određenja (Herrington CS, 2020). Prema tradicionalnoj podeli EC su klasifikovani prema Bokhmanu na tip I, endometrioidni karcinom endometrijuma (eng. *endometrioid endometrial carcinoma*, EEC) i tip II, karcinomi endometrijuma ne - endometrioidne morfologije. EEC su dominantno estrogen zavisni, nastaju na bazi hiperplazije i imaju povoljniju prognozu. EC tip II, nastaju na bazi atrofije endometrijuma, agresivnijeg su biološkog ponašanja i povezani su sa pojavom mutacije gena TP53. EEC čini 85% slučajeva i predstavlja visoko estrogeno zavisan tumor, sa mnoštvom dokaza koji ukazuju nastanak na bazi hiperplazije (Bokhman, 1983).

1.3.2. Molekularna klasifikacija karcinoma endometrijuma

Aktuelne metode stratifikacije EC uključuju grupisanje na osnovu molekularno bioloških karakteristika, koje su prepoznate kao visoko povezane sa specifičnim kliničkim tokom, suštinski nezavisne od histološkog podtipa i gradusa. Ciljevi nove klasifikacije obuhvataju prvenstveno unapređenje prognostičke vrednosti klasifikacije karcinoma endometrijuma, ali i podizanje stope

reproducibilnosti, kao i stepena slaganje između inicijalne dijagnoze postavljene na materijalu dobijenom kiretažom kaverna uterusa sa konačnim nalazom utvrđenim histopatološkim pregledom nakon histerektomije.

Molekularna kategorizacija se zasniva na preciznoj interpretaciji imunohistohemijske (IHC) analize broja mutacija popravke - neslaganja (eng. *mismatch repair*, MMR), IHC analizi ekspresije p53 proteina (proteinskog produkta onkogena TP53), kao i analizi mutacija gena koji kodira enzim DNK polimerazu epsilon (eng. *polymerase epsilon*, POLE) genskim sekvencioniranjem.

Novi sistem molekularne klasifikacije definiše četiri tipa EC:

1) Ultramutirani (POLE - mutantni) EC su najfrekventniji u grupi mlađih žena unutar populacije pacijentkinja sa EC. Oni ne pokazuju korelaciju biološkog ponašanja sa poznatim metaboličkim faktorima, i karakterišu se veoma dobrim kliničkim ishodima, niskom stopom recidiviranja, nezavisno od histološkog tipa, kao i mortalitetom manjim od 1%.

2) Hipermutirani (eng. *MMR deficient*, MMRd) EC se javljaju u starosno heterogenoj grupi pacijentkinja i predstavljaju grupu tumora sa umereno dobrom prognozom koja je zavisna od kliničkog stadijuma. MMRd karakteriše mikrosatelitska nestabilnost usled deficitne popravke neslaganja, sa desetostruko većom stopom mutacija u odnosu na grupu mikrosatelitski stabilnih tumora (eng. *micro satellite stable*, MSS) i tumora sa niskom stopom MMR mutacija (eng. *MMR-proficient*, MMRp). Većina slučajeva je posledica somatskih mutacija a u oko 10% slučajeva javlja se u okviru Linčovog sindroma, kao posledica deficitnog MMR procesa unutar germinativnih ćelija, dok je većina slučajeva posledica somatskih mutacija, prvenstveno povezanih sa epigenetski uzrokovanom hipermetilacijom promotora MLH1 gena.

3) EC sa velikim brojem kopija p53 proteina (p53 - abnormalan) karakterišu mutacije gena TP53, sa značajnim porastom broja kopija, i niskom stopom broja mutacija. Ovaj molekularni profil je pronađen u 20% EC. Uprkos činjenici da je mutacija p53 pojava karakteristična za serozni karcinom i karcinosarkom uterusa, približno 50% tumora ove molekularne grupe čine pacijentkinje sa EC drugih histoloških tipova, uključujući slučajeve EEC niskog gradusa. Ovu grupu karakteriše nesrazmerano visok stepen mortaliteta (50 - 70%).

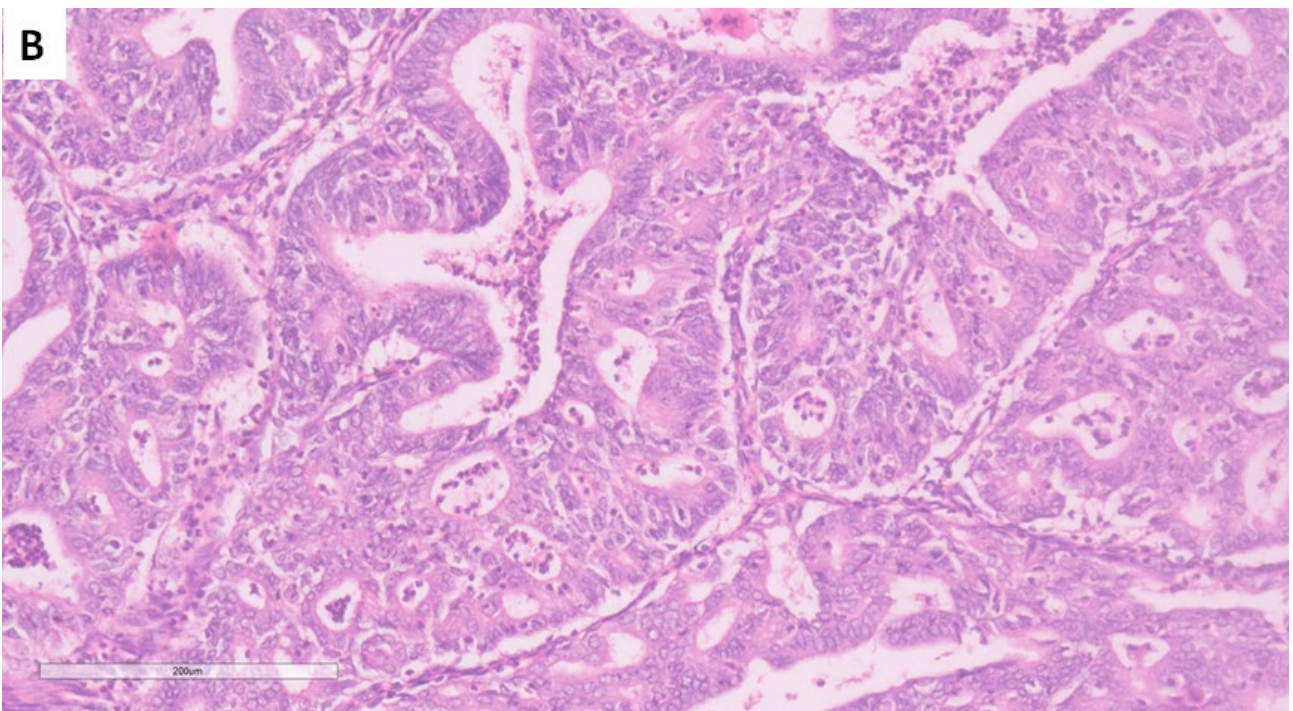
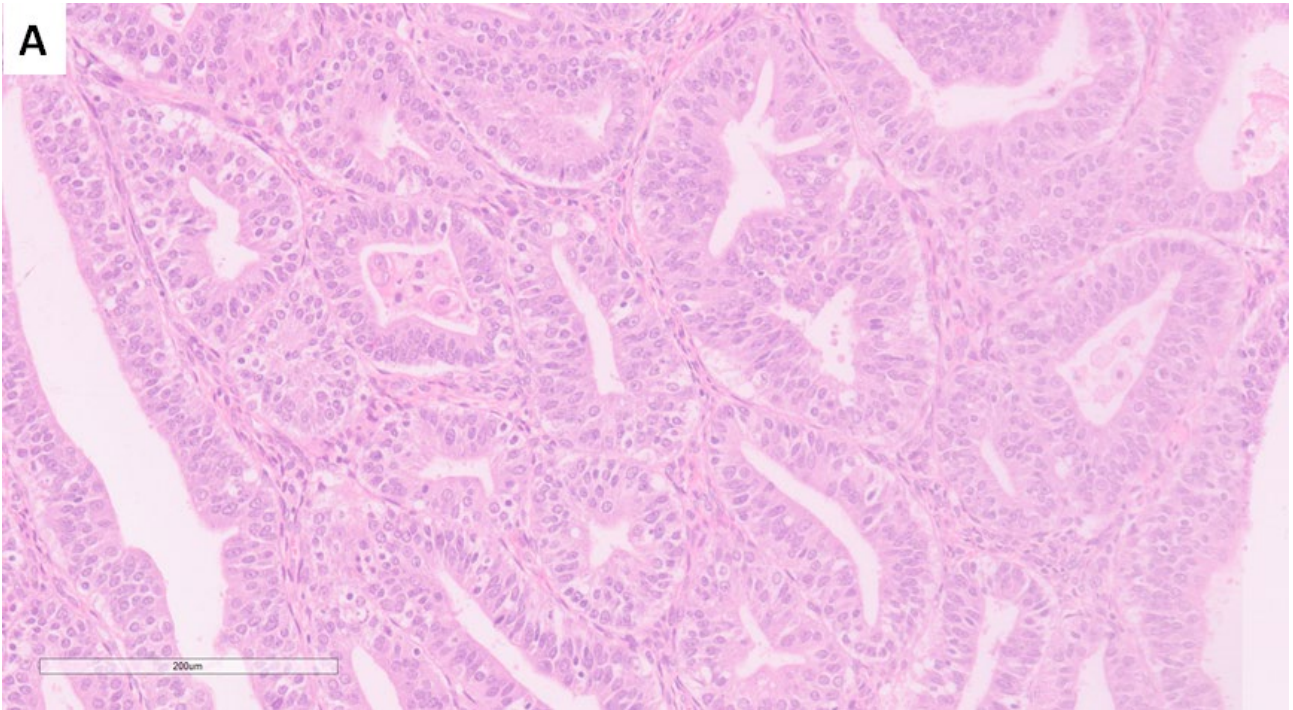
4) EC bez specifičnog molekularnog profila (eng. *no specific molecular profile*, NSMP) predstavlja dijagnozu isključenja i odnosi se na grupu tumora koju čine EC bez uočenog odstupanja u ekspresiji p53, bez POLE mutacija, kao i MMRp EC. NSMP čine najvećim delom EEC i karakteriše je prognoza koja varira od odlične do umereno povoljne, i koja je visoko zavisna od kliničkog stadijuma bolesti i histološkog gradusa i podtipa tumora (Crosbie, 2022).

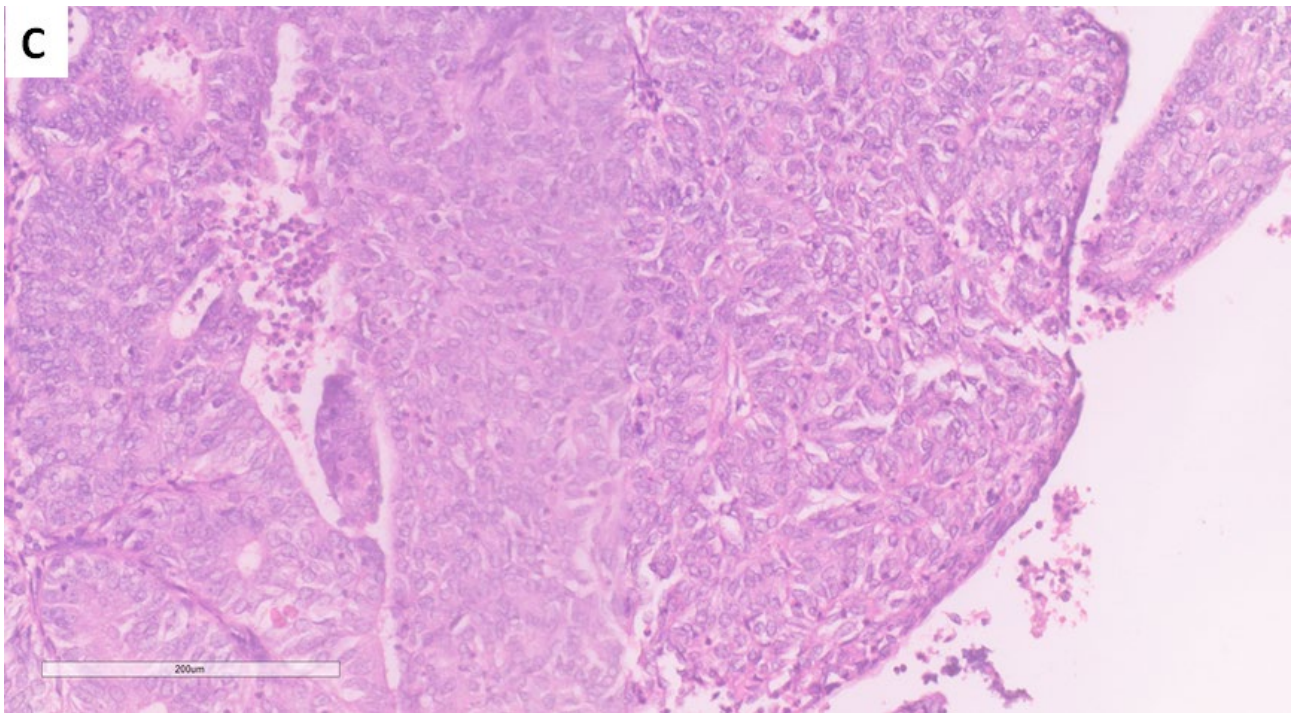
1.3.3. Određivanje gradusa endometrioidnog karcinoma endometrijuma

Ključni prognostički i prediktivni faktori za EC su histološki gradus i klinički stadijum tumora. Aktuelnim sistemom gradiranja, prema FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*), EC su podeljeni na: dobro, srednje i slabo diferentovane tumore (gradusa 1, 2 i 3), dok su ove kategorije, u slučaju EEC, grupisane kao promene niskog gradusa (eng. *low grade* - gradusi 1 i 2) i promene visokog gradusa (eng. *high grade* - gradus 3).

FIGO sistem gradiranja se zasniva na glandularnoj arhitektonici. Dobro diferentovan EEC ima karakterističanu glandularnu arhitektoniku, gde se pored pleomorfizma uočava tkivna atipija, koja se odlikuje pojavom blisko postavljenih tumorskih žlezda bez prisustva razdvajajuće strome, što se naziva kompleksnim obrascem rasta. Sa progresijom dediferencijacije, tumorske žlezde postaju sve bliže postavljene i zbijanjem formiraju polja solidnog izgleda, a u daljem toku se uočavaju sve uniformnija polja tkiva sa opadajućom mogućnošću raspoznavanja žlezdanih struktura, što se

naziva solidnim obrazcem rasta. Određivanje histološkog gradusa EC je bazirano na proceni zastupljenosti navedenih obrazaca rasta. Tumori gradusa 1 imaju $\leq 5\%$ tumorskog tkiva sa solidnim obrascem rasta, dok ostatak tkiva grade jasno uočljive tumorske žlezde u kompleksnom obrascu. Tumori gradusa 2 imaju 6% do 50%; a tumori gradusa 3 su sa $>50\%$ tumorskog tkiva sa solidnim obrascem rasta (Slika 3). Pri gradiranju EEC neophodna je distinkcija između solidnih polja rasta tumora i delova tumora sa skvamoznom metaplazijom. Gradus EEC se uvećava za vrednost 1, u slučajevima kada je citološka atipija visoko izražena u preko 50% tumorskih ćelija. (Soslow, 2019).





Slika 3. Endometrioidni karcinom endometrijuma A) dobro diferentovan – gradus 1, B) srednje diferentovan – gradus 2 i C) slabo diferentovan – gradus 3. HE x200

1.3.4. Određivanje stadijuma karcinoma endometrijuma

Stadijum bolesti prema Tumor-Nekroza-Metastaza (TNM) baziranom sistemu i FIGO klasifikaciji je određen u zavisnosti od sledećih parametara: ograničenost tumora na telo uterusa, dubina invazije miometrijuma (u zavisnosti da li je dubina invazije veća ili manja od 50% debljine), invzija strome cerviksa, lokalna invazija okolnih struktura (zahvatanje seroze uterusa, adneksa, vagine, parametrija, mukoze creva, mokraćne bešike), prisustvo metastaza u pelvičnim i paraaortalnim limfnim čvorovima, kao i prisustvo udaljenih metastaza (Brierley, 2016; FIGO Cancer Report, 2018) (Tabela 1-4).

Tabela 1. TNM klasifikacija karcinoma uterusa: T stadijum

T stadijum	Opis	Oznaka
Tx	Ne postoji mogućnost evaluacije primarnog tumora	Tx
T0	Nema dokaza o prisustvu primarnog tumora	T0
Tis	Carcinoma in situ	Tis
T1	Tumor ograničen na telo materice	T1 stadijum neodređen
	Tumor ograničen na telo materice, lokalizovan unutar endometrijuma, vrši invaziju manje od polovine debljine miometrijuma	T1a
	Tumor ograničen na telo materice, vrši invaziju polovinu ili preko polovine debljine miometrijuma	T1b
T2	Tumor vrši invaziju strome grlića materice bez širenja izvan materice	T2
T3	Tumor vrši invaziju lokalnih i/ili regionalnih struktura	T3 stadijum neodređen
	Tumor vrši invaziju seroze materice ili adneksalne strukture (direktnim širenjem ili metastazirajući)	T3a
	Tumor vrši invaziju vagine ili parametrija (direktnim širenjem ili metastazirajući)	T3b
T4	Tumor vrši invaziju mokraćne bešike ili mukoze creva	T4

Tabela 2. TNM klasifikacija karcinoma uterusa: N stadijum

N stadijum	Opis	Oznaka
N stadijum neodređen	Ne postoji mogućnost evaluacije limfnih nodusa	N stadijum neodređen
N0	Nema dokaza o prisustvu metastaza u limfnim nodusima	N0
	Izolovane tumorske ćelije dijametra do 0.2mm iz jednog ili više regionalnih limfnih nodusa	N0(i+)
N1	Metastaze u pelvičnim limfnim nodusima	N1 neodređen
	Metastaze u pelvičnim limfnim nodusima dijametra do 2mm, veće od 0.2mm	N1mi
	Metastaze u pelvičnim limfnim nodusima dijametra većeg od 2mm	N1a
N2	Metastaze u paraaortalnim limfnim nodusima	N2 neodređen
	Metastaze u paraaortalnim limfnim nodusima dijametra do 2mm, veće od 0.2mm	N2mi
	Metastaze u paraaortalnim limfnim nodusima dijametra većeg od 2mm	N2a

Tabela 3. TNM klasifikacija karcinoma uterusa: M stadijum

M stadijum	Opis
Mx	Ne postoji mogućnost evaluacije prisustva udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze, podrazumevaju (metastaze u ingvinalnim limfnim nodusima, plućima, jetri, kostima i peritonealne metastaze, ne podrazumevaju (metastaze u vagini, adneksalnim strukturama, pelvičnim i paraaortalnim limfnim nodusima)

Tabela 4. FIGO klasifikacija stadijuma karcinoma uterusa

FIGO stadijum	Opis	Oznaka
I	Tumor ograničen na telo materice	I
	Tumor ograničen na telo materice, ne vrši invaziju ili vrši invaziju u manje od polovine debljine miometrijuma	IA
	Tumor ograničen na telo materice, vrši invaziju polovine ili u preko polovine debljine miometrijuma	IB
II	Tumor vrši invaziju strome grlića materice bez širenja izvan materice	II
III	Tumor vrši invaziju lokalnih i/ili regionalnih struktura	III
	Tumor vrši invaziju seroze materice ili adneksalne strukture (direktnim širenjem ili metastazirajući)	IIIA
	Tumor vrši invaziju vagine ili parametrija (direktnim širenjem ili metastazirajući)	IIIB
	Metastaze u pelvičnim i/ili paraaortalnim limfnim nodusima	IIIC
	Metastaze u pelvičnim limfnim nodusima	IIIC1
	Metastaze u paraaortalnim sa ili bez metastaza u pelvičnim limfnim nodusima	IIIC2
IV	Tumor infiltracija mokraćne bešike i/ili mukoze creva, sa ili bez udaljenih metastaza	IV
	Tumor infiltracija mokraćne bešike i/ili mukoze creva	IVA
	Prisustvo udaljenih metastaza uključujući metastaze u trbušnoj duplji i/ili metastaze u ingvinalnim limfnim nodusima	IVB

1.3.5. Prekancerozne i hiperplastične promene endometrijuma

Prekancerozne lezije endometrijuma su od značaja pri ranoj dijagnostici kao i proceni rizika za razvoj EC. Kroz evoluciju patohistološke dijagnostike, u svrhu povećanja dijagnostičke i prediktivne preciznosti, klasifikacija ovih hiperplastičnih lezija je izmenjena i unapređena. Ustanovljene aktuelne standardizovane kategorije hiperplastičnih promena su rezultat kako uniformisanja patohistoloških nalaza, koji su predstavljali prepreku usled visokog stepena neslaganja pri analizi od strane više patologa, tako i rezultat grupisanja morfoloških formi hiperplastičnih promena u jedinstvene grupe, na osnovu korelacije sa kliničkim tokom, podižući prediktivnu vrednost ovih nalaza. Vrednost tradicionalnih klasifikacija, nije samo od istorijskog značaja, već je uvid u nju od važnosti radi unapređenog razumevanja hiperplastičnih promena od strane patologa. Tradicionalno hiperplastične promene su sredinom 20-og veka bile klasifikovane u četiri histološke kategorije:

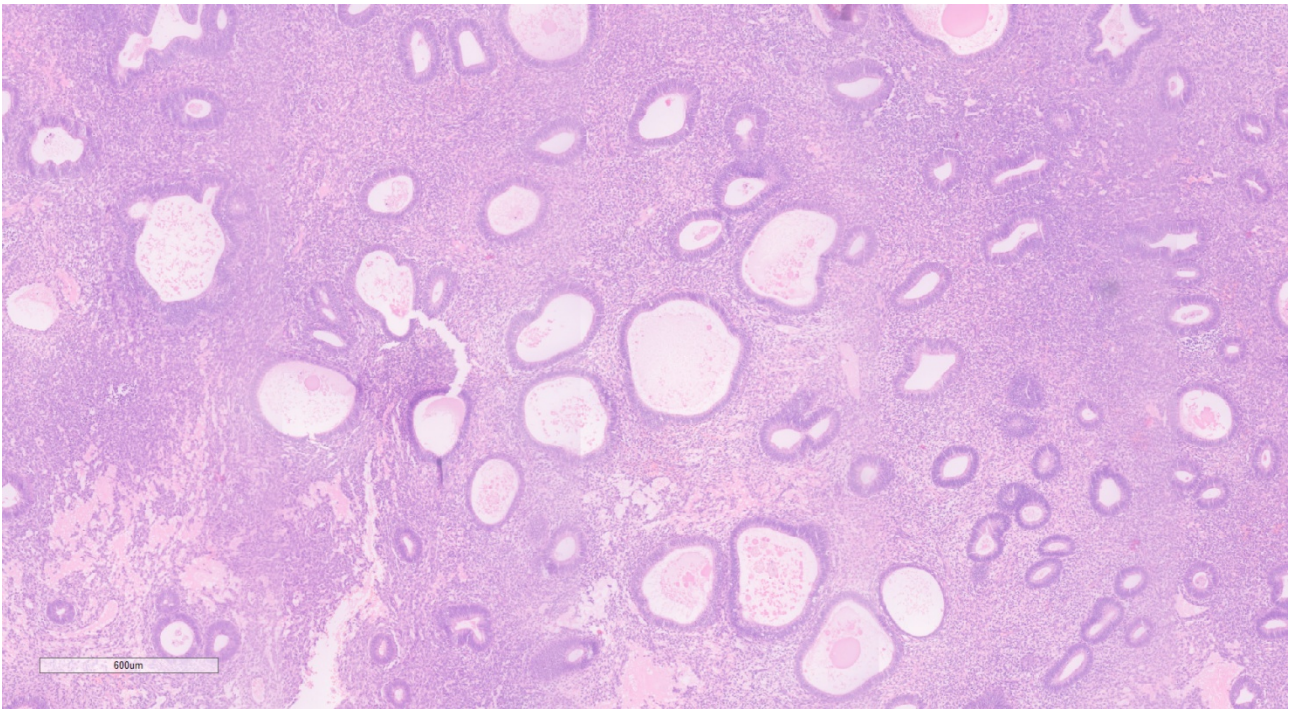
1. Cistična hiperplazija endometrijuma (lat. *Hyperplasia endometrii cystica*): Ovaj nalaz je smatran regularnim nastavnim proliferativne faze menstrualnog ciklusa, i definisan je umnožavanjem žlezdanih i stromalnih struktura endometrijuma. U žlezdanoj komponenti je analizirano karakteristično prisustvo cistične dilatacije, i prema distribuciji ova promena je definisana kao fokalna ili difuzna. Analizom ćelijskih osobina, kao što su prisustvo mitozna i nukleocitoplazmatski indeks, promena je bivala semikvantitativno ocenjena kao blaga, umerena ili teška (Slika 4).

2. Prosta hiperplazija endometrijuma (lat. *Hyperplasia simplex endometrii*): Definisana kao promena morfološki nalik endometrijumu u kasnoj proliferativnoj fazi, sa lakostepenom dilatacijom lumena žlezda.

3. Adenomatозна hiperplazija endometrijuma (lat. *Hyperplasia adenomatosa endometrii*): Definisana kao umnožavanje žlezda, bez prateće proliferacije stromalnog tkiva, sa blisko postavljenim umnoženim žlezdanim strukturama između kojih nema razdvajajućeg vezivnog tkiva ili prisustvom u vidu diskretnih trakastih ostataka veziva. U ćelijama žlezdanog epitela su vidljivi znaci atipije. Promena je na osnovu distribucije podeljena na fokalnu i difuznu, a na osnovu procena nivoa atipije semikvantitativno određena kao laka, srednja ili teška.

4. Glandularna hiperplazija sa naglašenom atipijom (lat. *Hyperplasia glandularis atipica*): Promena je definisana naglašenom pojavom atipije, a na osnovu toga klasifikovana kao podtip sa dominantno naglašenom tkivnom ili sa dominantno naglašenom ćelijskom atipijom (Oprić, 2004).

U periodu između između 1994-2014. godine prema klasifikaciji svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO) ustanovljene 2014. godine, hiperplastične promene su definisane na osnovu dva ključna histološka parametra: tkivne arhitektonike i ćelijske atipije. Promena tkivne arhitektonike je definisana kao prisutvo prostog ili kompleksnog obrasca rasta umnoženih žlezda endometrijuma. Prosti obrazac je definisan kao umnožavanje žlezda endometrijuma praćeno proliferacijom strome koja ih međusobno razdvaja. Ovaj obrazac je najbliža morfološka paralela pojmovima cistične i proste hiperplazije endometrijuma u okviru tradicionalne histološke klasifikacije. Kompleksni obrazac, je definisan kao nalaz proliferacije blisko postavljenih žlezda endometrijuma bez razdvajajuće strome ili sa diskretnim trakastim ostacima stromalnog tkiva između umnoženih žlezdanih struktura. Ovaj obrazac je najbliža morfološka paralela adenomatoznoj i atipičnoj hiperplaziji endometrijuma, podtipu sa tkivnom atipijom u okviru tradicionalne histološke klasifikacije. Dok je ćelijska atipija predstavljena kroz karakteristične parametre pleomorfizma, kao što su: hiperhromazija, povećan nukleocitoplazmatski indeks, odstupanja od regularnog oblika, veličine, konzistencije jedra, odstupanje od regularne građe ćelije, prisustvo mitozna regularne ili patološke morfologije.



Slika 4. Hiperplazija endometrijuma sa cističnom dilatacijom žlezdanih lumena, bez znakova ćelijske atipije. HE x40

Na osnovu zastupljenosti ovih parametara definisana su četiri podtipa hiperplazija endometrijuma:

1. Prosta hiperplazija bez atipije (lat. *Hyperplasia simplex non-atipica*)
2. Prosta hiperplazija sa atipijom (lat. *Hyperplasia simplex atipica*)
3. Kompleksna hiperplazija bez atipije (lat. *Hyperplasia complex non-atipica*)
4. Kompleksna hiperplazija sa atipijom (lat. *Hyperplasia complex atipica*)

Prema klasifikaciji WHO iz 2014. godine hiperplastične promene su reklasifikovane u dve kategorije:

- a) prosta hiperplazija endometrijuma bez atipije/benigna hiperplazija endometrijuma (eng. *benign endometrial hyperplasia*, BEH) i
- b) kompleksna hiperplazija endometrijuma sa atipijom/endometrialna intraepitelna neoplazija (eng. *endometrial intraepithelial neoplasia*, EIN).

BEH je hormonski indukovana promena endometrijuma koja se klinički uobičajeno uočava ultrazvučnim pregledom materice kao zadebljanje tkiva endometrijuma. Ove promene često su praćene abnormalnim uterinim krvarenjem i histološkim nalazom u vidu umnožavanja žlezda i strome endometrijuma. Kod BEH, rizik od razvoja EC je 1 - 3%.

EIN se smatra prekursorskom lezijom EC, a podaci bazirani na kliničkom iskustvu su pokazali da će kod 30% žena sa dijagnostikovanom EIN-om, tokom prve godine praćenja, biti dijagnostikovan EC (Herrington, 2020, Fadare, 2019).

1.4. Angiogeneza

Rast krvnih sudova se odvija u vidu vaskulogeneze i angiogeneze. Vaskulogeneza je stvaranje primitivnih krvnih sudova i vaskularnih pleksusa u delovima tkiva koja nisu prethodno vaskularizovana. Odvija se diferencijacijom angioblasta i karakteristična je za embrionalni period razvoja. Angiogeneza je rast novih krvnih sudova iz prethodno postojeće vaskulature. Postoje četiri mehanizama angiogeneze: vaskularno grananje, intususepcija, elongacija i inkorporacija progenitorskih endotelnih ćelija poreklom iz kostne srži u zid postojećih kapilara na mestu formiranja novog krvnog suda. Prvi, i najšire prihvaćeni, mehanizam vaskularnog grananja se naziva klasična angiogeneza. Ovaj proces se odvija kroz faze aktivacije endotelnih ćelija, degradaciju bazalne membrane, migracije i proliferacije endotelnih ćelija sa formiranjem vaskularnih pupoljaka i tubusa, stabilizacije novostvorenog krvnog suda, mobilizacijom pericita i razvojem glatkomišićnih ćelija. Intususepcija se odvija deponovanjem matriksa uzdužnom osom lumena krvnog suda, duž koje se zatim odvija migracija endotelnih ćelija, konačno deleći ga na dva odvojena suda. Vaskularna elongacija se najvećim delom javlja tokom faze rasta organizma. Angiogeneza je deo regularnog razvoja u fetalnom dobu, dok je u adultnom periodu deo fizioloških procesa, kao što su menstrualni ciklus, zarastanje rana, ali je i deo patoloških procesa poput endometrioze, dijabetske retinopatije i reumatoidnog arteritisa. Najvećim delom je stimulirana hipoksijom tkiva (Roškar, 2021; Holland, 2003).

Rast tumora se, prema njegovoj zavisnosti od vaskularizacije, može podeliti na dve faze. Prva je inicijalna faza rasta kada je tumorski rast nezavistan od stvaranja novih krvnih sudova, zbog sposobnosti da se snabde potrebnim nutritivima i kiseonikom putem difuzije iz okolnih tkiva. Ova faza traje sve dok zapremina tumorskog tkiva ne postane veća od 2 mm³. Sledeća faza je vaskularno zavisna, kada je za dalji rast neophodno formiranje novih krvnih sudova, kako bi se podržali metabolički zahtevi neoplastičnog tkiva (Roškar, 2021). U fiziološkim uslovima je regulisana faktorima koji je stimulišu ili inhibiraju, dok rast tumora karakteriše gubitak kontrole nad angiogenezom. Ovo se dešava kroz konstantnu sintezu proangiogenih i smanjenjem stvaranja antiangiogenih faktora, što se naziva „angiogeni prekidač“, a dovodi do brzog formiranja krvnih sudova. Nedovoljno inhibirana, patološka angiogeneza, je ključni proces nekontrolisanog rasta tumora (Weston, 2000).

1.5. Vaskularni endotelni faktor rasta

Familija vaskularnih endotelnih faktora rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) je grupa proangiogenih liganada kojoj pripadaju VEGF-A, -B, -C, -D, i placentalni faktor rasta (eng. *placental growth factor*, PlGF). Otkrivena je od strane Dvorjak 1983. godine. VEGF imaju centralnu ulogu u procesu fiziološke i patološke angiogeneze. Ovi faktori rasta su sekretovani i unutar masnog tkiva i povezani su sa gojaznošću. Oni uspostavljaju svoje centralne efekte preko specifičnih receptora kao što su VEGFR1 (eng. *fms-like tyrosine kinase 1*, FLT1), VEGFR2 (eng. *kinase insert domain receptor*, KDR), i VEGFR3. Ostali receptori preko kojih VEGF deluju su neuropilin 1 i 2 (Žyła, 2014; Sharkey, 2000). Uprkos činjenici da svi spadaju u grupu srodnih tirozin kinaznih membranskih receptora, efekti VEGF receptora se razlikuju. Dok su FLT1 i KDR povezani sa angiogenezom, VEGFR3 učestvuje u procesu limfangiogeneze. Poznata je i solubilna forma VEGF-R1 (sFLT) za koju se smatra da predstavlja antiangiogeni marker.

VEGF-A je endogeno sekretovani protein koji povećava vaskularnu permeabilnost, stimuliše proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija, i u brojnim studijama je prepoznat kao jedan od ključnih faktora fiziološke i patološke angiogeneze. Ekspresija VEGF-A dokazana je kao faktor angiogeneze u benignim i malignim lezijama endometrija. Uloga njihove ekspresije je dokazana u fiziološkoj angiogenezi menstrualnog ciklusa, kao i u patološkoj angiogenezi i pokazan je uticaj egzogene hormonske terapije na smanjenje njihove ekspresije. VEGF-A je najistaknutiji i najčešće proučavan proangiogeni faktor, za koji je pokazano da ima centralnu ulogu u angiogenezi EC.

Pojedine studije pokazuju povezanost povećane imunohistohemijske ekspresije VEGF-A i procesa dediferencijacije tumorskih ćelija EC. Navedene studije istovremeno sugeriraju povećanje ekspresije VEGF-A u EC kao marker lošije prognoze i agresivnijeg biološkog ponašanja tumora. Dziobek i sar. navode postojanje pozitivne korelacije nivoa imunohistohemijske ekspresije VEGF-A sa histološkim gradusom EC, dok je povećanje ekspresije VEGF-B uočeno u EC gradusa 1 i 2 u poređenju sa zdravim kontrolama. Takođe je uočeno prateće sniženje ekspresije ovog faktora u tumorima gradusa 3 koje je protumačeno kroz potencijalnu regulatornu ulogu VEGF-B u kontroli procesa angiogeneze u EC, čiji gubitak utiče na agresivnije biološko ponašanje koje prati gubitak diferencijacije. Holland i sar. navode slične rezultate na uzorku zdravih kontrola, atipične kompleksne hiperplazije i EC gradusa 1, 2 i 3. Ova studija navodi odsutvo ekspresije VEGF-A u benignim promenama endometrijuma, nasuprot rastu ekspresije u slučajevima atipične kompleksne hiperplazije, kao i u EC. Ovi nalazi se mogu protumačiti kao potencijalna uloga VEGF-A u malignoj transformaciji u tkivu endometrijuma (Dziobek, 2019; Holland, 2003).

Pojedinim studijama analizirana je prognostička i prediktivna uloga serumskih koncentracija VEGF, kao i solubilnih formi njihovih receptora. Saarelainen i sar. su analizom preoperativno određenih serumskih vrednosti VEGF, sFLT i CD105 konstatovali postojanje korelacije između povišenih vrednosti VEGF u serumu pacijentkinja koje su podvrgnute histerektomiji zbog EEC, sa prisustvom metastaza (Saarelainen, 2014). Pojedinim studijama je pokazana povezanost preoperativno povišenih nivoa VEGF-R2 sa dužinom preživljavanja, kao i vrednost povećane serumske koncentracije VEGF kao prediktivnog faktora prisustva metastatskih depozita unutar paraaortalnih limfnih nodusa kod pacijentkinja sa EC (Kotowicz, 2017).

Standardni terapijski protokol za EC čini histerektomija sa ili bez adjuvantne radioterapije i/ili hemoterapije, u zavisnosti od rizika od recidiva bolesti. Zbog nedostatka efikasnih terapijskih opcija, lečenje pacijenata sa EC u uznapredovalom stadijumu je veoma kompleksno.

Zbog važnosti neovaskularizacije za rast tumora, uloženi su napor da se razvije antiangiogena terapija za lečenje EC. Glavne klase antiangiogenih lekova su anti-VEGF monoklonska antitela (bevacizumab), solubilni VEGFR (aflibercept), inhibitori angiopoetin-Tie2 receptora (trebananib) i inhibitori tirozin kinaze (brivanib, cediranib, nintedanib, sunitinib i lenvatinib) (Roškar, 2021). Bevacizumab je trenutno najšire ispitivani lek iz grupe anti-VEGF ciljnih lekova. On predstavlja monoklonsko anti-VEGF antitelo koje se već primenjuje u terapiji karcinoma kolona, pluća i dojke. Uprkos višegodišnjim ispitivanjima monoterapija bevacizumabom nije dala povoljne terapijske ishode u populaciji pacijentkinja sa EC. S druge strane, terapijski režim koji je uključivao kombinaciju hemoterapije i bevacizumaba pokazao je produženje perioda preživljavanja bez progresije, kao i ukupno veće preživljavanje u grupi pacijentkinja sa TP53 mutiranim EC (p53 - abnormalan). Istovremeno, novije studije su pokazale da bevacizumab daje obećavajuće rezultate u kombinaciji sa mTOR inhibitorima everolimusom i temsirolimusom. Tokom prekliničkih ispitivanja, ovaj terapijski režim je pokazao nizak nivo toksičnih i neželjenih efekata, a u studiji je takođe definisana preporučena terapijska doza i istraživanje je ušlo u II fazu kliničkih ispitivanja (Lee, 2021). Najnovija klinička ispitivanja pokazuju da je kombinacija inhibitora tirozin kinaze, lenvatiniba, i monoklonskog antitela koje je blokator PD-1 (eng. *Programmed Cell Death Protein 1*, PD-1) po imenu pembrolizumab jedina pokazala veću stopu preživljavanja u poređenju sa hemoterapijom. Ova kombinacija je posebno efikasna kod prethodno lečenih pacijentkinja sa EC koji pripadaju grupi mikrosatelitski stabilnih (MSS) i tumorima sa niskom stopom MMR mutacija (MMRp) (Park, 2022).

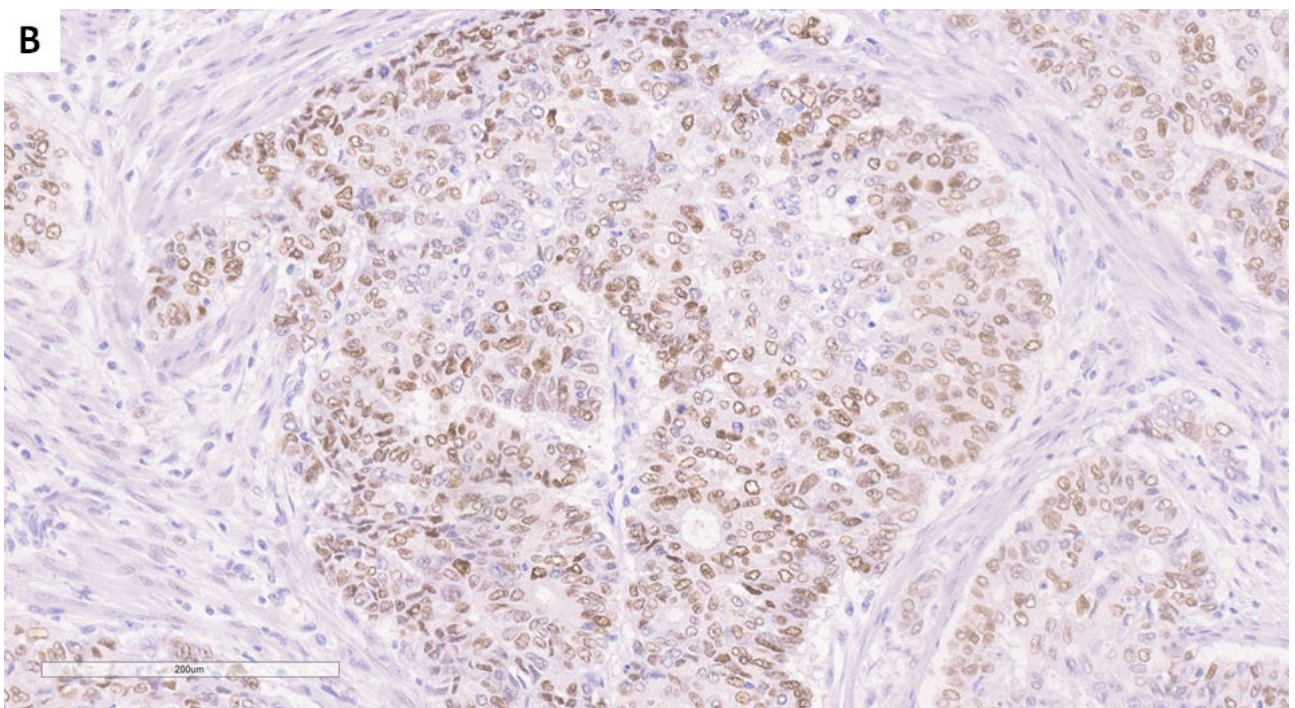
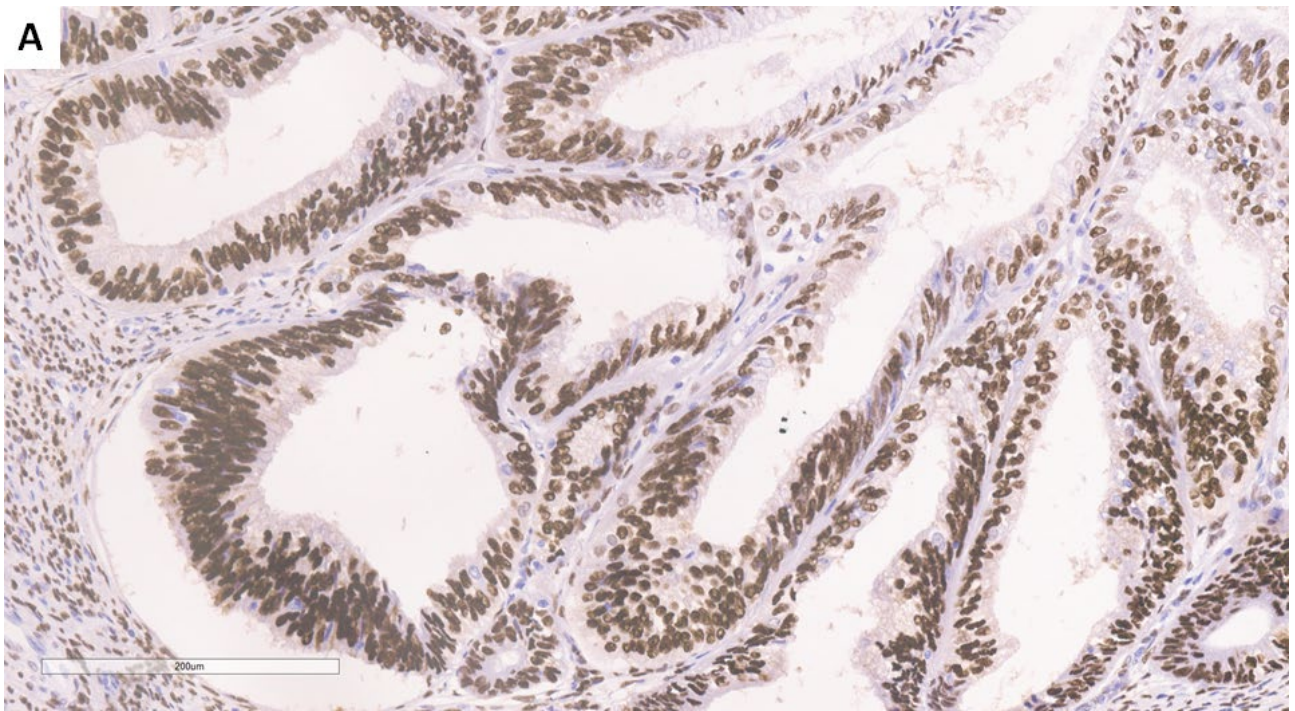
Ipak, antiangiogena terapija je ograničena na male specifične grupe pacijenata, povezana je sa neželjenim efektima i mnogi pacijenti koji su prvobitno reagovali na ciljanu terapiju, vremenom razvijaju rezistenciju, što ukazuje na dalju potrebnu boljim razumevanjem mehanizama i faktora uključenih u angiogeni proces EC. Potencijalni obećavajući iskoraci u unapređenju ciljanih terapijskih opcija za EC se mogu očekivati u okviru definisanja terapijskih grupa oslanjajući se na

molekularne karakteristike EC, ali i u usklađivanju patohistološke sa novom molekularnom klasifikacijom, kroz tumačenje genetskih aberacija u kontekstu poznatih bioloških specifičnosti podtipova EC.

1.6. Estrogeni receptor

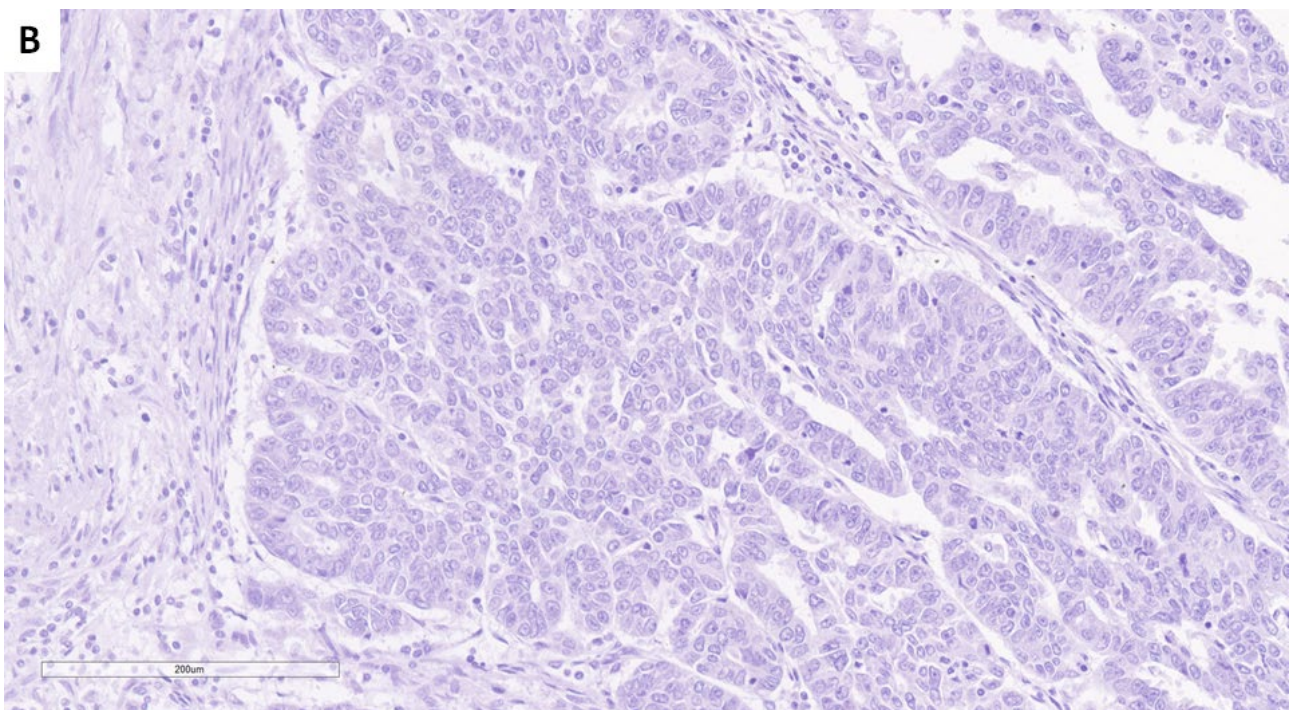
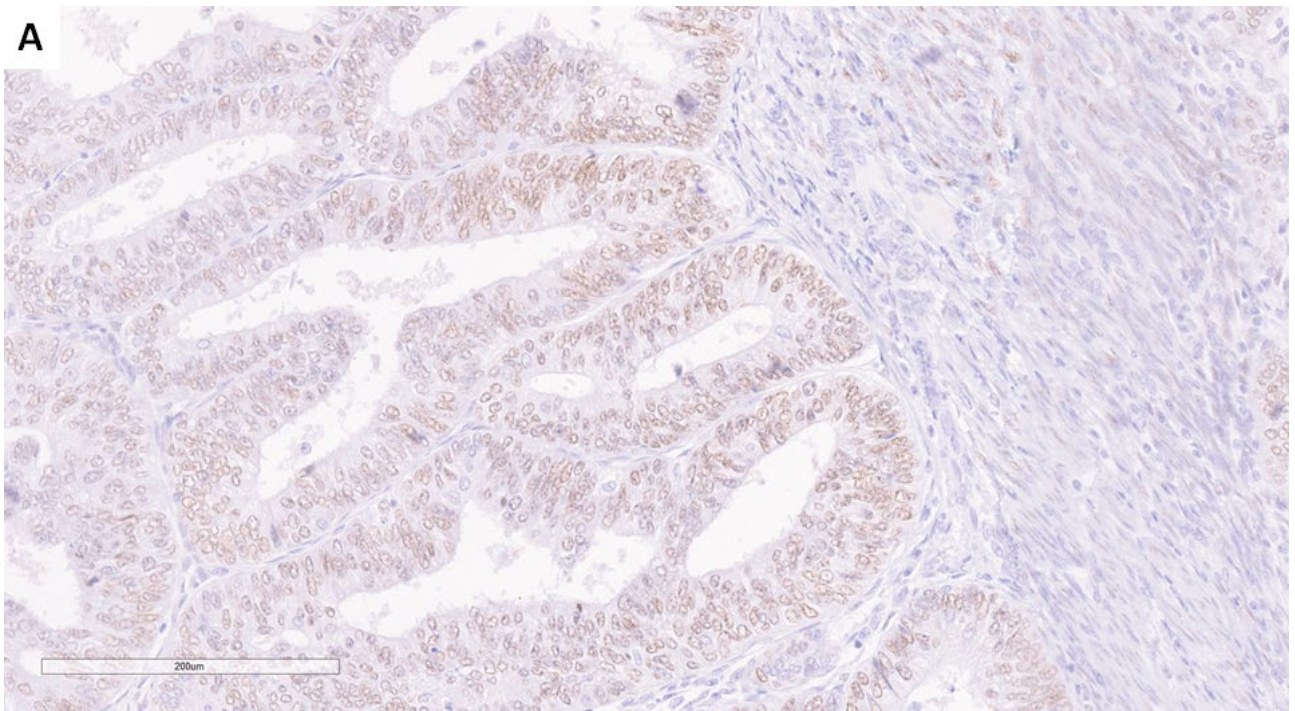
Estrogeni receptor pripada superfamiliji jedarnih receptora ligand vezujućih transkripcionih faktora koji posreduju biološko dejstvo estrogena. Poznate su dve izoforme ER, alpha i beta, i njihova aktivnost ima poznato dejstvo na proliferativnu aktivnost zdravog tkiva endometrijuma. Dosadašnja paradigma karcinogeneze glasi da je nastanak tip I karcinoma endometrijuma posredovan dominantno dugotrajnom hiperestrogenom stimulacijom, neoponiranom progesteronskom stimulacijom. EEC često u različitoj meri eksprimira ER, i smatra se da je njegov rast stimulisan dejstvom estrogena (Rodriguez, 2021.) (Slika 5).

Pored toga u kliničkoj praksi je pokazana, uloga i značaj nivoa ekspresije ER u karcinomima endometrijuma kao nezavistan, i kao pouzdaniji prognostički faktor od histološkog gradusa i dubine invazije (Martin, 1983). Međutim, uloga estrogena u kancerogenezi endometrijuma nije u potpunosti razjašnjena, utoliko što se većina karcinoma endometrijuma javlja u peri- ili post menopauzi, kada su nivoi estrogena u serumu generalno smanjeni, što može biti delom objašnjeno činjenicom da maligna transformacija ima tendenciju javljanja u aktivno proliferišućim ćelijama, usled višeg potencijala akumulacije somatskih mutacija kroz greške u replikaciji DNK tokom duplikacija i mitozu. T. Miyamoto i T. Shiozawa su u svojoj studiji definisali kancerogenezu posredovanu estradiolom (E2) kao sposobnost geneze novih kancerskih ćelija: 1) iz aktivno replicirajućih ćelija sa deficitom sistema za popravku DNK i 2) posredstvom metabolita E2 koji mogu dovesti do nastanka somatskih mutacija, stoga bi se moglo očekivati da fiziološki visoki nivoi estrogena u serumu, odnosno visoki nivoi E2, kao što se često vidi kod žena sa normalnim menstrualnim ciklusom, stimulišu kancerogenezu endometrijuma. Međutim, 80% EK se javlja kod žena u peri- ili postmenopauzi, čiji su nivoi E2 u relativno niskom opsegu (Miyamoto, 2019). Nivoi E2 u serumu su takođe često relativno niski kod žena koje primaju hormonsku supstitucionu terapiju (HST), što je dobro poznati faktor rizika za nastanak EC, posebno naglašen u grupi pacijentkinja koje primaju estrogene preparate bez primene progestina (Miyamoto, 2019; Weiderpass, 1999). Pojedine žene sa HST su pokazale visok nivo E2, što sugerise zavisnost koncentracije od primenjene doze E2. Autori su razmatrali i PCOS koji predstavlja jedan od poznatih faktora rizika za nastanak EK kod mladih žena, iako pacijentkinje sa PCOS često pokazuju nešto niže nivoe E2 u serumu od zdravih žena (Miyamoto, 2019; Navaratnarajah, 2008.). Takođe treba napomenuti da rizik od EC može zavisiti ne samo od nivoa E2, već i od hiperandrogenemije kod PCOS. Ova klinička opažanja su nazvana "paradoksom karcinoma endometrijuma", u okviru nepotpuno razjašnjene uloge ER u kancerogenezi EC. Pokazano je da ER α ima dominantnu ulogu u rastu endometrijuma, što se bazira na studijama fiziologije endometrijuma gde je pokazano da je ekspresija ER α najviša u proliferativnoj fazi, dok pokazuje značajan pad u sekretornoj fazi menstrualnog ciklusa. Istovremeno je uočeno smanjenje ekspresije ER β i androgenog receptora, uz opažanje da je njihov osnovni nivo ekspresije tokom svih faza menstrualnog ciklusa niži od nivoa ekspresije ER α . Navedene studije su pokazale i da je dejstvo ER α oponirano aktivnošću ER β (Mylonas, 2004; Mylonas, 2005). Estrogeni receptor alfa (ER α) je glavni faktor preko kojeg estrogeni stimulišu mitogenu i proliferativnu aktivnost u zdravom endometrijumu i EC (Saimi, 2021).



Slika 5. Ekspresija ER α A) visokog intenziteta i B) srednjeg intenziteta u tkivu endometrioidnog karcinoma endometrija, ER α x200

Pokazano je da estradiol (E2) stimuliše proliferaciju i migraciju ćelija EC dejstvom na ER α . Paradoksalno, pokazalo se da je prisustvo ER α pozitivnosti u EEC pozitivan prognostički marker, za razliku od ER α negativnih EC (Slika 6) koji su agresivniji tumori sa lošijom prognozom (Backes, 2016).



Slika 6. Ekspresija ER α A) niskog intenziteta i B) odsustvo ekspresije ER α u tkivu endometrioidnog karcinoma endometrija, ER α x200

Pokazano je da je odsustvo ekspresije ER α u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa stadijumom i gradusom bolesti, ali ne sa vremenom bez recidiva bolesti ili sa ukupnim preživljavanjem pacijentkinja. Odsustvo ekspresije ER α je snažan prediktor zahvatanja limfnih čvorova. Pacijentkinje sa ER α negativnim EC češće bivaju dijagnostikovane sa višim gradusom i u uznapređovalom stadijumu bolesti (Backes, 2016). Eksperimentima na zdravom i neoplastičnom tkivu endometrija je potvrđena je smanjena ekspresija ER β u EC, kao i promenu odnosa ekspresije ER α i ER β u neoplastičnim promenama endometrija (Mylonas, 2005; Hapangama, 2015; Häring, 2012). Upravo ovi podaci nam daju potencijalni deo odgovora na navedeni paradoks, dok istovremeno sugerišu da efekat ER α nije samostalno odgovoran za nastanak, razvoj i perzistiranje karcinoma endometrija, što ukazuje da, neopozivo značajno, dejstvo ER na nastanak EC, 1) ne predstavlja samostalni faktor, 2) da pored dejstva estrogena neoponiranog progesteronom ulogu u tumorskom rastu ima i aktivnost ER α neoponirano aktivnošću ER β , 3) da aktivnost ER α potencijalno ima ulogu "inicijalne kapisle" u malignoj transformaciji, dok faktori progresije tumorskog rasta i perzistencije tumorske tkivne arhitektonike ostaju otvorena dilema. Navedena opažanja nas navode na zaključak da je ispitivanje povezanosti ekspresije ER α sa nivoima ekspresije FKBPL logičan i obećavajući sledeći korak u našem istraživanju koji nudi potencijalni novi uvid u rasvetljenje dela neodgovorenih pitanja u vezi sa biologijom endometrioidnog karcinoma endometrija.

1.7. FKBPL

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*) je jedan od aktuelno široko ispitivanih faktora koji vrše inhibiciju angiogeneze, utvrđenog anti-tumorskog dejstva, sa perspektivom u razvoju ciljane terapije kod onkoloških bolesnika. On pripada proteinima iz visoko postojane familije imunofilina, specifično grupi FK506 vezujućih proteina (eng. *FK506-binding protein*, FKBP). Njeni članovi imaju fundamentalnu ulogu u regulaciji signalnih puteva inflamacije, adaptivnog imunološkog odgovora i kancerogeneze, kroz svoju funkciju šaperona i svojom peptidilprolil izomeraznom (PPIase) aktivnošću. Osnovni član ove porodice, FKBP12 je dobro poznati vezujući ligand imunosupresivnih lekova, takrolimus (FK506) i sirolimus (rapamicin). Takrolimus smanjuje aktivnost peptidilprolil izomeraze vezivanjem za FKBP12, stvarajući novi kompleks. Ovaj kompleks FKBP12 – FK506 intezaguje sa i inhibira kalcineurin, čime inhibira i transdukciju signala T-limfocita i transkripciju interleukina-2. Veći proteini familije FKBP, kao što su FKBP51, FKBP52 i FKBPL, sadrže dodatne regione, uključujući domene ponavljanja tetratrikopeptida (TPR), koji su važni za raznovrsnost njihove protein - protein interakcije sa signalnim putevima povezanim sa inflamatornim odgovorom.

Otkriće FKBPL-a se dogodilo 1997. godine u okviru studije koja je imala cilj pronalaženje gena koji imaju ulogu u formiranju rezistencije indukovane radioterapijom (Robson, 1997). Inicijalno imenovan „8.6“ i protein „regulisan jonizujućim zračenjem“ (eng. *downregulated by ionizing radiation*, DIR1) (Robson, 1999). Nakon otkrića, analizom strukture sekvence proteina (Slika 7) ustanovljeno je strukturalno preklapanje i ustanovljena je srodnost sa proteinima predstavnicima familije FK506 vezujućih proteina. Strukturalno preklapanje je uočeno kako na nivou celokupne sekvence aminokiselina, kao i na funkcionalnim PPIase-nim i TPR domenima, a ispitivani protein je imenovan proteinom sličnim FK506 vezujućim proteinima, FKBPL (Slika 8) (Tabela 5). Daljim ispitivanjem funkcije proteina, pokazano je da FKBPL ima ulogu u stvaranju radiorezistencije. U okviru studije kojom su ispitivani proteini potencijalno povezani sa p21, FKBPL je identifikovan i imenovan kao WISp39 (*WAF-1/CIP1 stabilizing protein 39*). Utvrđeno je da FKBPL/WISp39 ima značajnu ulogu u multiproteinskom kompleksu uključenom u regulaciju kontrolne tačke faze G2 ćelijskog ciklusa nakon izlaganja visokim dozama zračenja. Pokazana je uloga FKBPL-a u stabilizaciji p21. Jascur i saradnici su predložili da FKBPL kao potencijalno mesto ciljane terapije

može pružiti povoljnije ishode u grupi bolesnika sa tumorima sa prekomernom ekspresijom p21 i/ili pojavom hemorezistentncije i/ili radiorezistencije (Jascur, 2005; Robson, 2012).

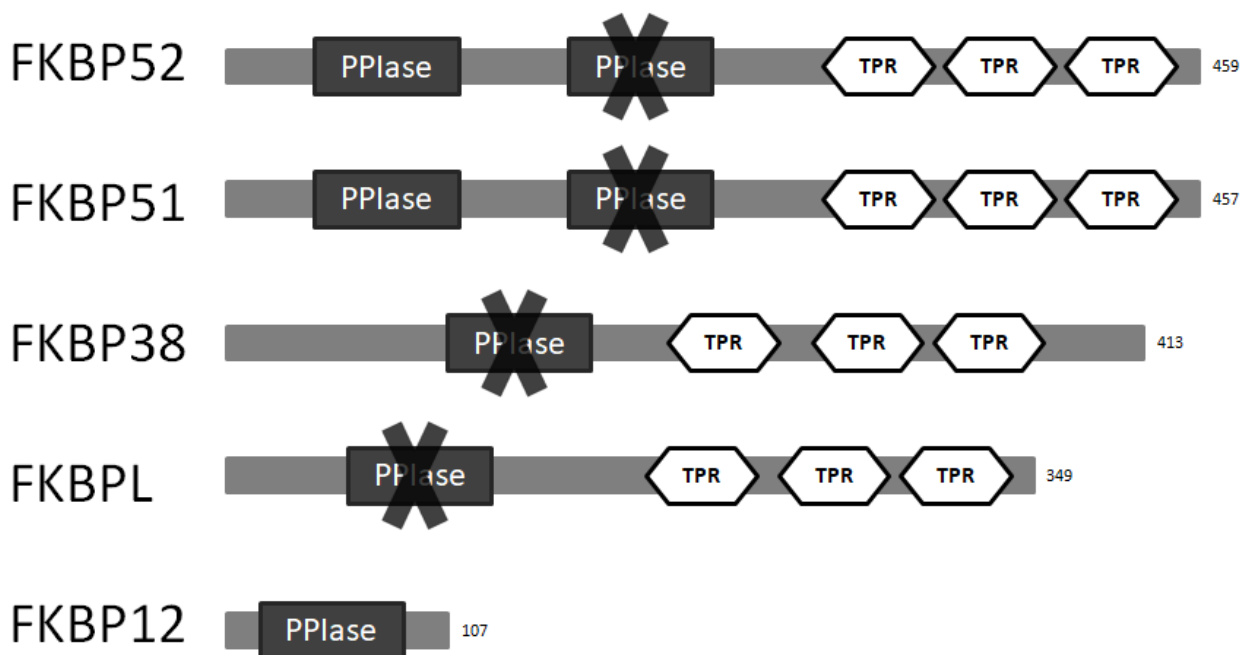
METPPVNTIGEKDTSQPQQEWEKNLRENLD~~SVIQIRQQPRDPPTETL~~
~~ELEVSPDPAS~~QILEHTQGAEKLVAELEGDSHKSHGSTSQMPEALQAS
DLWYCPDGSFVKKIVIRGHGLDKPKLGS.C.CRVLALGFPGSGPPEG
WTELTMGVGPWREETWGELIEKCLES~~MCQGEAELQLPGHTGPPV~~
GLTLASFTQGRDSWELETSEKEALAREERARGTELF~~RAGNPEGAAR~~
CYGRALRLLLTLP~~PPGPPERTVLHANLAAGQPQLAAQS.C.DRVLER~~
EPGHLKALYRRGVAQAALGHNLEKATADLKKVLAIDPKNRAAQEE
LGKVVIQGVVIQGLRKMFG

Slika 7. Aminokiselinska sekvenca FKBPL (eng.*FK506-binding protein-like*) sa crvenom bojom naglašenom sekvencom antiangiogenog peptidnog FKBPL derivata je AD-01. Izvor: Robson, 2012.

FKBPL je član familije FK506 vezujućih proteina, divergentnog delovanja, važan za interakciju sa molekularnim šaperonom Hsp90 i ključni negativni regulator rasta tumora, angiogeneze i metastaziranja. Specifičnost njegovog dejstva nastupa usled zanemarljive aktivnosti PPlaze, a sa dominantnom aktivnošću TPR domena. Pokazano je da je FKBPL prirodno sekretovani antiangiogeni protein koji ispoljava svoje efekte ciljanim dejstvom na površinski ćelijski receptor, CD44, na aktivno migrirajućim endotelnim ćelijama. Ovim putem FKBPL inhibira migraciju i formiranje krvnih sudova (Annett, Nov 2020).

L. Nelson i saradnici su pokazali značaj nivoa ekspresije FKBPL kod pacijenata sa karcinomom dojke (eng. *breast cancer*, BC), kao prognostičkog faktora preživljavanja specifičnog za karcinom dojke (eng. *breast cancer specific survival*, BCSS). U ovoj studiji je pokazano da je niži nivo ekspresije FKBPL povezan sa lošijom prognozom preživljavanja, kao i da je nivo ekspresije FKBPL zadržao sopstveni prognostički značaj nezavisno od drugih poznatih prognostičkih faktora. Pokazano je da je FKBPL značajan prediktor intervala bez relapsa u grupi pacijentkinja sa karcinomima dojke sa visokom ekspresijom ER dok je granična prediktivna značajnost opisana u grupi tretiranoj tamoksifenom (Nelson, 2015). Uloga FKBPL kao negativnog regulatora rasta tumora, metastaziranja i angiogeneze ustanovljena je u studijama BC. Mc Clements i saradnici su prikazali inhibitorno dejstvo FKBPL i njegovih derivata na rast matičnih ćelija raka dojke (eng. *cancer stem cells*, CSC) u okviru predkliničkih studija koje su na putu razvijanja ciljane FKBPL bazirane terapije. Ova studija pokazuje da FKBPL i njegov peptidni derivat ALM201 smanjuju migraciju i invaziju CSC dojke, kao i da inhibiraju rast mamosfera CSC dojke otpornih na endokrinu terapiju (McClements, 2019).

FKBPL je deo kompleksa kohaperona HSP90/ER α . Stabilnu prekomernu ekspresiju FKBPL u CSC dojke je praćena povećanom zavisnošću tumorskog rasta od estrogene stimulacije i posledično većom senzitivnošću tumora na antiestrogenu terapiju tamoksifenom. McKeen i saradnici su pokazali da FKBPL učestvuje u regulaciji ekspresije ER i da je visoka ekspresija FKBPL je praćena smanjenjem nivoa ER α u CSC dojke (McKeen, 2010).



Slika 8. Prikaz proteinskog preklapanja celokupne sekvence, PPIase - nog domena i domena TPR između FKBP1 i predstavnika familije FKBP imunofilina, FKBP52, FKBP51, FKBP38, i FKBP12. Izvor: Robson T, 2012.

FKBP1 (eng. *FK506-binding protein-like*); PPIaza (eng. *peptidyl-prolyl cis–trans isomerase*); TPR (eng. *tetratricopeptide repeat*)

Ekspresija FKBP1 takođe je ispitivana na kulturama CSC karcinoma ovarijuma i ciljana terapija bazirana na FKBP1 je pokazala antiangiogeno dejstvo kojim dovodi do usporavanja rasta kolonija kancerskih stem ćelija karcinoma ovarijuma. Ova studija o karcinomu jajnika je pokazala da terapijski peptidni derivati FKBP1-a stimulišu diferencijaciju CSC jajnika i smanjuju njihov broj, kao i da odlažu inicijaciju tumora i rast visoko vaskularizovanih ksenotransplantata. Ova studija navodi kao zaključak da se antitumorski efekat FKBP1-a i njegovih terapijskih peptidnih derivata ostvaruje putem poremećaja procesa angiogeneze (Annett, Feb 2020.). S druge strane, informacije i studije o ekspresiji i ulozi FKBP1-a u EC su izuzetno retke. Pojedinačna eksperimentalna studija u kojoj je ispitivan genetski profil EC u cilju definisanja potencijalnih smernica za istraživanje novih biomarkera navodi postojanje ekspresije gena koji kodira FKBP1 unutar stromalnih ćelija, koje su mikrodisekcijom izdvojene iz tkivnih isečaka EC. Ova studija je istovremeno analizirala mikrodisekovanu komponentu tumorskih ćelija EC, i u rezultatima nisu navedeni podaci o ekspresiji gena koji kodira FKBP1 (Iguchi, 2014.). Prema dostupnim relevantnim izvorima podataka, u okviru centralizovane baze atlasa humanih proteina (eng. *The Human Protein Atlas*, THPA) imunohistohemijska ekspresija FKBP1 je pronađena u epitelu žlezda endometrijuma, pokazujući citoplazmatsku, membransku i nuklearnu ekspresiju, umerenog i visokog intenziteta, sa karakteristično izraženom luminalnom pozitivnošću pri pozitivnosti visokog intenziteta (Slika 9). Prema ovom relevantnom izvoru u ćelijama strome endometrijuma nije zabeležena ekspresija (The Human Protein Atlas, Tissue expression of FKBP1, n.d.). Isti izvor navodi podatke o ekspresiji FKBP1 u tumorskim ćelijama EC. Podaci su pokazali da ekspresija, u tumorskim ćelijama EC, varira od slučajeva EC bez ekspresije do pojave ekspresije niskog i retko umerenog intenziteta. U

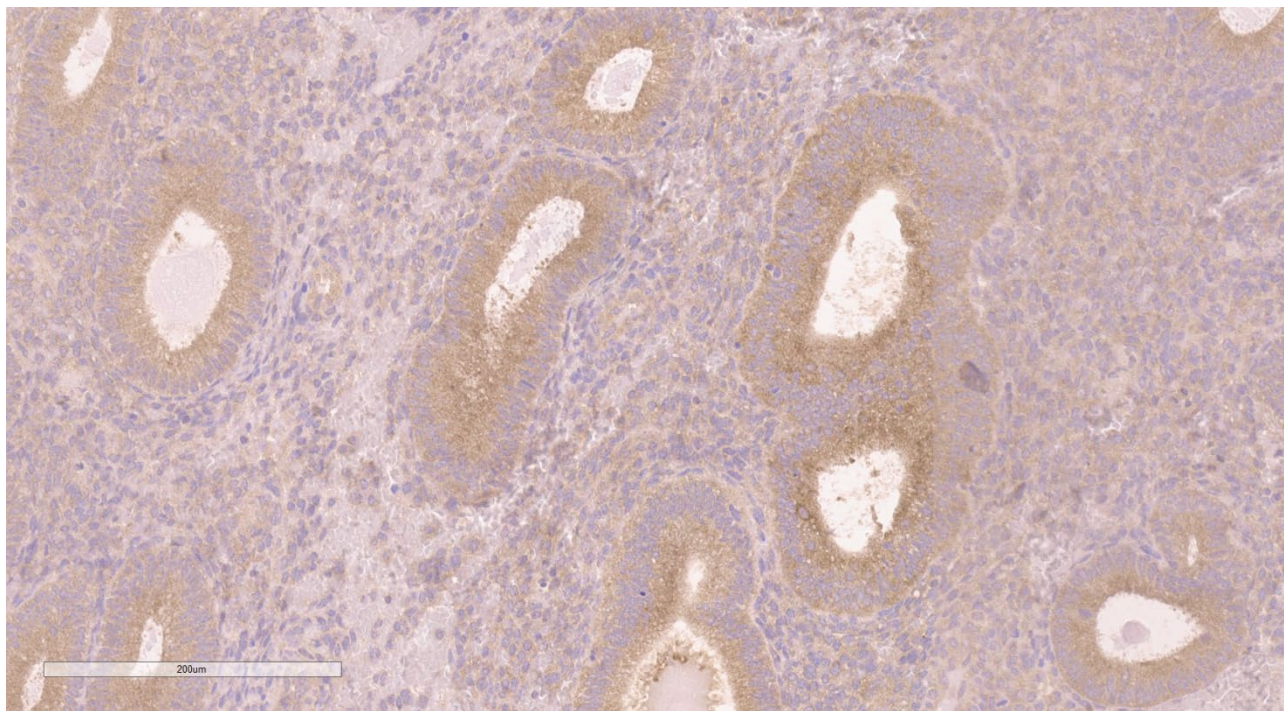
bazi podataka ovog relevantnog izvora nije dostupna informacija o ekspresiji FKBPL u stromalnim ćelijama EC (The Human Protein Atlas, Expression of FKBPL in endometrial cancer, n.d.).

Tabela 5. Prikaz procentualne homologije predstavnika familije FKBP sa FKBPL unutar celokupne sekvence aminokiselina i u okviru PPIase-nog i TPR domena. Izvor: Robson, 2012.

	Stepen homologije sa FKBPL (%)		
	Celokupna sekvenc	PPIase-ni domen	TPR domen
FKBP52	23	17	33
FKBP51	21	10	29
FKBP38	14	7	21
FKBPL	100	100	100
FKBP12	17	8	-

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); PPIaza (eng. *epeptidyl-prolyl cis-trans isomerise*); TPR (eng. *tetratricopeptide repeat*)

Prema dostupnim i relevantnim izvorima, do sada nije izvedena analiza značaja nivoa ekspresije ovog proteina u EK, sa detaljnim sagledavanjem ključnih prognostičkih i prediktivnih osobina.



Slika 9. Ekspresija FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*) visokog intenziteta u žlezdanom tkivu endometrijuma, sa karakterističnom luminalno naglašenom pozitivnošću, FKBPL x200

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Definisani su sledeći ciljevi:

1. Ispitivanje nivoa ekspresije FKBPL, VEGF-A i ER u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma.
2. Ispitivanje povezanosti nivoa ekspresije FKBPL sa nivoima ekspresije VEGF-A i ER u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i poređenje sa odnosima nivoa ekspresije u benignoj hiperplaziji endometrijuma.
3. Ispitivanje povezanosti nivoa ekspresije FKBPL sa prosečnom gustinom krvnih sudova u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i u benignoj hiperplaziji endometrijuma.
4. Ispitivanje povezanosti nivoa ekspresije FKBPL u endometrioidnom karcinomu endometrijuma sa dubinom invazije miometrijuma, prisustvom limfovaskularne invazije, histološkim gradusom tumora i kliničkim stadijumom bolesti

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorak

Uzorci su dobijeni iz Kliničko-bolničkog centra Zemun, Beograd, Srbija u periodu od 10 godina (2010 - 2020). Studija je obuhvatila dve grupe ispitanica:

Prvu grupu čine slučajevi EEC. Ukupno 90 pacijentkinja podvrgnutih histerektomiji, kojima je dijagnostikovano EEC. Kriterijumi za uključivanje pacijenata sa dijagnozom EEC bili su: izvršena histerektomija, dostupnost kliničkih podataka o stadijumu bolesti i dostupnost parafinskih blokova koji sadrže tumorsko tkivo koje pokriva najmanje 5 mm². Kriterijumi isključenja su bili: drugi histološki tipovi EC, nedovoljna količina tumorskog tkiva za imunohistohemijsko bojenje i analizu, druga udružena maligna oboljenja i podatak o prethodnoj primeni onkološke terapije.

Drugu grupu čine slučajevi BEH. Ukupno 40 pacijenata podvrgnutih eksplorativnoj kiretaži, kojima je dijagnostikovano BEH. Kriterijum isključenja iz studije je bio uzorkovanje kiretmana kavuma uterusa van proliferativne faze, kod pacijentkinja u reproduktivnom periodu.

Reprezentativni parafinski kalupi i odgovarajuće pločice obojene hematoksilinom i eozinom (HE), na kojima su dijagnostikovani slučajevi od interesa, u periodu od 2010 - 2020. godine, su izdvojeni iz arhive Službe za kliničku patologiju, Kliničko bolničkog centra Zemun. Patolog je evaluirao HE obojene pločice i odabrao parafinske kalupe sa kojih su isečeni preparati odgovarajuće veličine i kvaliteta. Potom su odabrani parafinski kalupi bili pregledani i u istraživanje su bili uključeni oni sa dovoljnom količinom tkiva za izradu potrebnih preseka za imunohistohemijsku analizu. Od svih dostupnih pločica, svakog pojedinačnog slučaja, je odabran po jedan reprezentativni preparat sa tumorskim tkivom površine najmanje 5 mm². Demografski, histološki i klinički podaci ispitanica su izdvojeni istorija bolesti pacijenata u Kliničko bolničkom centru Zemun. Analizirani su dostupni podaci o starosti svih pacijentkinja, patološkom i kliničkom stadijumu bolesti određenom prema TNM sistemu i FIGO sistemu određivanja stadijuma, histološkom gradusu određenom na osnovu FIGO sistema gradiranja, dubini invazije miometrija (eng. *depth of myometrial invasion*, DMI) i prisustvu limfovaskularne invazije (eng. *lymphovascular invasion*, LVI) kod pacijentkinja sa EEC. Imunohistohemijske analize, fotografisanje patohistoloških preparata i analize istih, su obavljene na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Odobrenje za upotrebu parafinskih kalupa i kliničkih podataka je usvojeno odlukom Etičkog odbora, KBC Zemun, broj rešenja 12/1.

3.2. Imunohistohemijska bojenja

Odabrani reprezentativni kalupi su sečeni na mikrotomu, a zatim su isečci tkiva debljine 4 μm premešteni u vodeno kupatilo odakle su preuzeti i nalepljeni na pločice. Isečci su zatim deparafinizovani i dehidrirani. Nakon toga je izvršeno demaskiranje antigena korišćenjem Tris (tris (hydroxymethyl) aminomethane) - pufera pH 9,0 za FKBPL i citratnog pufera pH 6,0 za VEGF-A i ERα, u vodenom kupatilu u trajanju od 30 min na temperaturi 95°C. Tokom blokiranja aktivnosti endogenih peroksidaza, pločice su tretirane rastvorom koji sadrži 3% vodonik peroksida u fosfatom puferisanom fiziološkom rastvoru (eng. *phosphate-buffered saline*, PBS) tokom 10 minuta. Nespecifično vezivanje antigena je blokirano korišćenjem 1% rastvora govedeg serumskog albumina (eng. *bovine albumin serum*, BSA) u PBS-u tokom 30 minuta. Korišćena su sledeća primarna antitela su: zečije-poliklonsko anti-FKBPL (kataloški broj: 10060-1-AP, *Proteintech*, 1:800) antitelo, mišje monoklonsko anti-VEGF (VG-1, *Santa Cruz, Dalas, Texas, SAD*, 1:100) antitelo i mišje monoklonsko antitelo za estrogini receptor (klon 6F11, *Novocastra, Newcastle, Tyne, UK*, 1:100). Period inkubacije za sva tri antitela je trajao 1 sat. Inkubacija sva tri antitela je izvršena na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, pločice sa tkivnim isečcima su isprane u PBS-u,

a zatim tretirane sistemom hromogena streptavidin - peroksidaza konjskog đubriva (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) u trajanju od 30 minuta. Nakon ovog koraka primenjen je EnVision sistem za detekciju (DAKO, Jena, Germany), korišćenjem 3,3'-diaminobenzidina kao supstratnog hromogena, a zatim je svaka pločica tretirana kontrastnim bojenjem Meyer-ovim hematoksilinom. Negativne kontrole su bile tretirane prema istom imunohistohemijskom protokolu, sa razlikom u korišćenju 1% BSA u PBS umesto primarnog antitela. Kao pozitivnu eksternu kontrolu za FKBPL, koristili smo tkivo štitaste žlezde.

3.3. Histopatološka evaluacija

Evaluacija imunohistohemijski obojenih preseka tkiva je izvršena dvostruko slepim očitavanjem. Sve slajdove su analizirala dva patologa sa 10 i 25 godina iskustva u dijagnostici u oblasti patologije ženskog reproduktivnog sistema (D.D.O. i D.M.O.).

Imunoreaktivnost antitela FKBPL je gradirana na dva načina (dvostrukim skorom):

a) semikvantitativno, sa dodeljenim vrednostima intenziteta ekspresije:

- 0 - bez ekspresije;
- 1 - slab intenzitet;
- 2 - umeren intenzitet;
- 3 - jak intenzitet reakcije antitela,

b) morfometrijskom metodom određivanja nivoa ekspresije FKBPL, kojom je izvršena selekcija signala u spektru boja odgovarajućeg hromogena. Nakon izdvajanja pozitivnog signala, na svakoj slici, je određen procenat površine vidnog polja sa pozitivnom reakcijom izračunat kao broj piksela vidnog polja podeljen brojem piksela sa pozitivnom reakcijom hromogena. polje od interesa je određeno izdvajanjem polja strome u okviru slike vidnog polja. Pri analizi će biti korišćen Color Threshold aplikacija, kao i Color Deconvolution aplikacija u okviru softvera za analizu slike *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Za izračunavanje prosečne površine vidnog polja korišćen je softver za analizu slike *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*.

Imunoreaktivnost antitela VEGF-A je gradirana na dva načina (dvostrukim skorom):

a) semikvantitativno, sa dodeljenim vrednostima intenziteta ekspresije:

- 0 - bez ekspresije;
- 1 - slab intenzitet;
- 2 - umeren intenzitet;
- 3 - jak intenzitet reakcije antitela,

b) morfometrijskom metodom određivanja nivoa ekspresije VEGF-A, kojom je izvršena selekcija signala u spektru boja odgovarajućeg hromogena. Nakon izdvajanja pozitivnog signala, na svakoj slici, je određen procenat površine vidnog polja sa pozitivnom reakcijom izračunat kao broj piksela vidnog polja podeljen brojem piksela sa pozitivnom reakcijom hromogena. polje od interesa je određeno izdvajanjem polja strome u okviru slike vidnog polja. Pri analizi će biti korišćen Color Threshold aplikacija, kao i Color Deconvolution aplikacija u okviru softvera za analizu slike *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Za izračunavanje prosečne površine vidnog polja korišćen je softver za analizu slike *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*.

Imunoreaktivnost antitela ER α je izmerena Allred skorom sa predstavljenim vrednostima 0 - 8, koji predstavlja zbir, vrednosti skora intenziteta reakcije i skora procenta pozitivnih ćelija. Skor intenziteta reakcije će biti izražen vrednostima:

- 0 - bez ekspresije;
- 1 - slab intenzitet;
- 2 - umeren intenzitet;
- 3 - jak intenzitet reakcije

Skor procenta ER α pozitivnih ćelija će biti izražen vrednostima:

- 0 - bez reakcije;
- 1 - manje od 1% pozitivnih epitelnih ćelija EEC ili BEH;
- 2 - 1 do 10% pozitivnih epitelnih ćelija EEC ili BEH;
- 3 - 11 do 33% pozitivnih epitelnih ćelija EEC ili BEH;
- 4 - 34 do 66% pozitivnih epitelnih ćelija EEC ili BEH
- 5 - 67 do 100% pozitivnih epitelnih ćelija EEC ili BEH.

Za vizuelizaciju krvnih sudova je korišćeno antitelo CD34, kao konstitutivni marker endotelnih ćelija. Prosečna gustina krvnih sudova u reprezentativnim vidnim poljima je analizirana korišćenjem *Vessel Analysis* aplikacije u okviru softvera za analizu slike *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*.

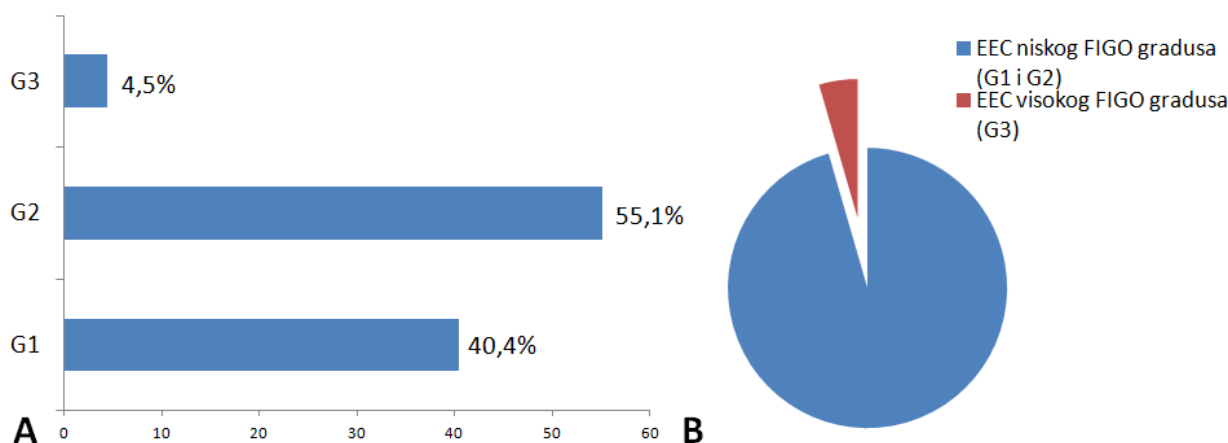
3.4. Statistička analiza

Demografske karakteristike ispitivane populacije, kliničke karakteristike tumora, imunohistohemijska ekspresija faktora angiogeneze FKBPL i VEGF, zatim ER i CD34+, kao i morfometrijskih parametara angiogeneze u endometrioidnom karcinomu uterusa su prikazani metodama deskriptivne statistike (aritmetičkom sredinom sa standardnom devijacijom ili medijanom sa interkvartilnim opsegom za numeričke podatke i apsolutnim i relativnim frekvencijama za atributivne podatke). Raspodela podataka je ispitana grafičkim metodama, kao i korišćenjem deskriptivnih statističkih mera, aritmetičke sredine, standardne greške i koeficijenta iskošenosti. Razlike između dve grupe uzoraka su analizirane korišćenjem Studentovog t testa (za nezavisne uzorke) ili Mann Whitney testa za numeričke podatke, i Pirsonovog Hi kvadrat testa i Fišerovog testa tačne verovatnoće za kategorijalne podatke. Kod varijabli sa više modaliteta je primenjena jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) ili Kruskal Volisov test. Povezanost ispitivanih varijabli je ispitana korišćenjem Pirsonov-og koeficijenta korelacije. Ukoliko nisu ispunjeni uslovi za primenu ovog koeficijenta, korišćen je Spirmanov koeficijent korelacije. Za koeficijente korelacije, pored p vrednosti, biće tumačena i tzv. veličina efekta (mala, srednja, jaka) preporučena od strane Koen-a (*engl. Cohen*). Univarijantna i multivarijantna logička regresija su upotrebljene u utvrđivanju povezanosti nivoa ekspresije FKBPL sa ostalim ispitivanim karakteristikama. Multiple regresione analize su sprovedene u više koraka, uz primenu metode najmanjih kvadrata. Ovaj metod je omogućio odabir limitiranog seta statistički značajnih prediktora, odabranih za uključanje u model na osnovu postojanja statističke značajnosti u prethodno sprovedenim analizama. Rezultati regresionih analiza su prikazani sledećim parametrima: B, Wald Chi-Square, odnos šansi (OŠ), i njemu pripadajući 95% interval poverenja (IP). Svi testovi su bili dvosmerni. $P < 0.05$ je bio smatran statistički značajnim. Statističke analize su sprovedene korišćenjem SPSS statističkog programa (IBM SPSS, verzija 21).

4.REZULTATI

4.1. Studijska populacija

Studija je obuhvatila uzorak od 90 slučajeva EEC, od kojih je jedan slučaj isključen iz rezultata studije, usled naknadno utvrđenih artefakta fiksacije, koji su značajno uticali na verodostojnost imunohistohemijskih bojenja usled autolitičnih promena tkiva i sledstvene degradacije proteinskih struktura, uključujući ispitivane antigene ciljnih proteina. Prosečna starost pacijentkinja u populaciji sa dijagnozom EEC bila je $65,58 \pm 8,59$ godina. U studiju je uključeno i 40 slučajeva BEH, dobijenih eksplorativnom kiretažom kavuma uterusa. Prosečna starost pacijentkinja u populaciji sa dijagnozom BEH je bila $45,23 \pm 5,79$ godina. U grupi pacijentkinja sa EEC je bilo 36 (40.4%) slučajeva FIGO gradusa 1, 49 (55.1%) slučajeva FIGO gradusa 2 i 4 (4.5%) slučajeva FIGO gradusa 3 (Slika 10). Prema objedinjenoj kategorizaciji histoloških gradusa koji se primenjuje u slučajevima endometrioidnog histološkog podtipa EC u grupi pacijentkinja sa malignom bolešću je bilo 95.5% (n=85) niskogradusnih (eng. *low grade*) karcinoma, dok su visokogradusni (eng. *high grade*) karcinomi činili 4.5% (n=4) ove grupe (Slika 10).



Slika 10. Zastupljenost histoloških gradusa u uzorku endometrioidnih karcinoma endometrija (eng. *endometrioid endometrial carcinoma*, EEC) (A); zastupljenost histoloških gradusa u uzorku EEC prema modifikovanoj kategorizaciji specifičnoj za EEC (B)

FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)

Relativno visoka biološka uniformnost je pored srodnih histoloških gradusa, u uzorku naše studije pokazana i kroz značajnu uniformnost stadijuma bolesti. Većina pacijentkinja sa EEC je dijagnostikovana u ranim stadijumima bolesti T1 62 (69,7%) prema TNM klasifikaciji i prvom stadijumu (stadijum I) klasifikovano prema FIGO sistemu. U grupi pacijentkinja sa EEC je bilo 30 (33.7%) slučajeva TNM stadijuma T1A, 32 (36%) slučajeva TNM stadijuma T1B, 18 (20.2%) slučajeva TNM stadijuma T2 i 9 (10.1%) slučajeva TNM stadijuma T3. U grupi pacijentkinja sa EEC je bilo 28 (31.5%) slučajeva FIGO stadijuma IA, 32 (36%) slučajeva FIGO stadijuma IB, 18 (20.2%) slučajeva FIGO stadijuma II i 10 (11.2%) slučajeva FIGO stadijuma III (Tabela 6).

Tabela 6. Prikaz zastupljenosti stadijuma karcinoma endometrijuma prema TNM i FIGO klasifikaciji

Endometrioidni karcinom endometrijuma n=89		
TNM stadijum (%)	T1A	33.7 (n=30)
	T1B	36.0 (n=32)
	T2	20.2 (n=18)
	T3	10.1 (n=9)
FIGO stadijum (%)	IA	31.5 (n=28)
	IB	36.0 (n=32)
	II	20.2 (n=18)
	III	11.2 (n=10)
	IV	1.1 (n=1)

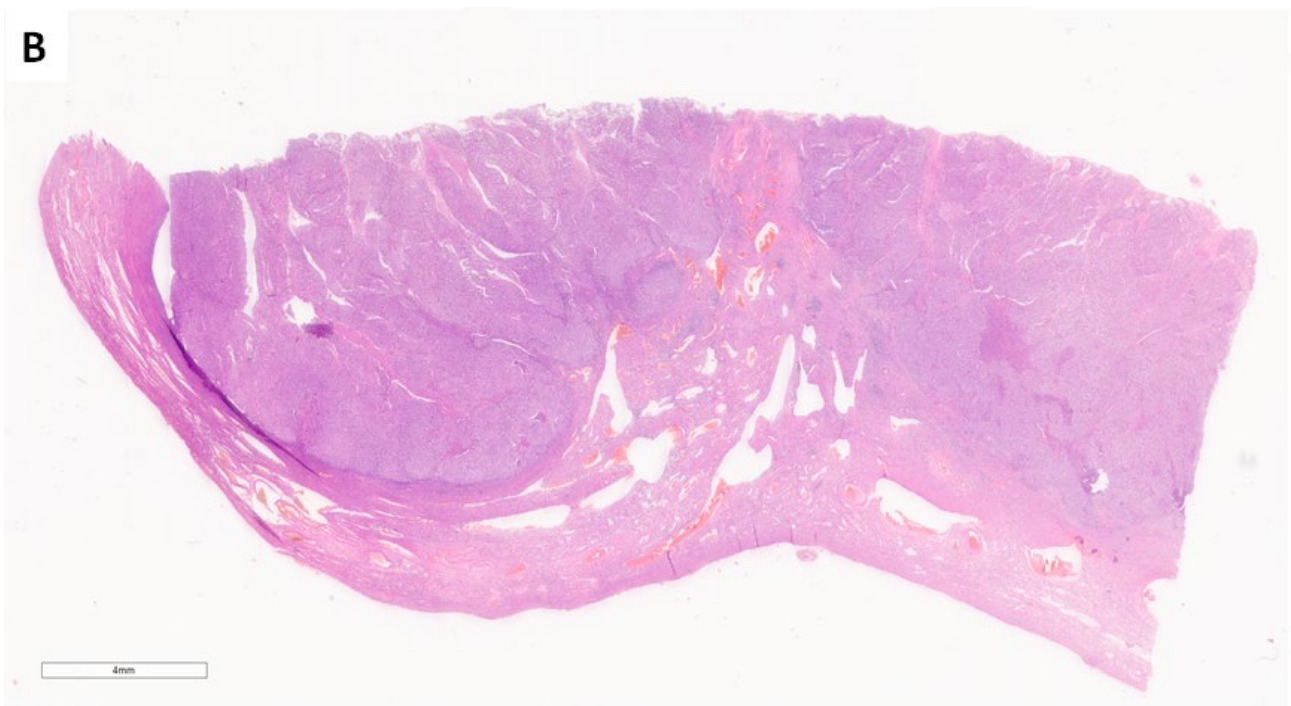
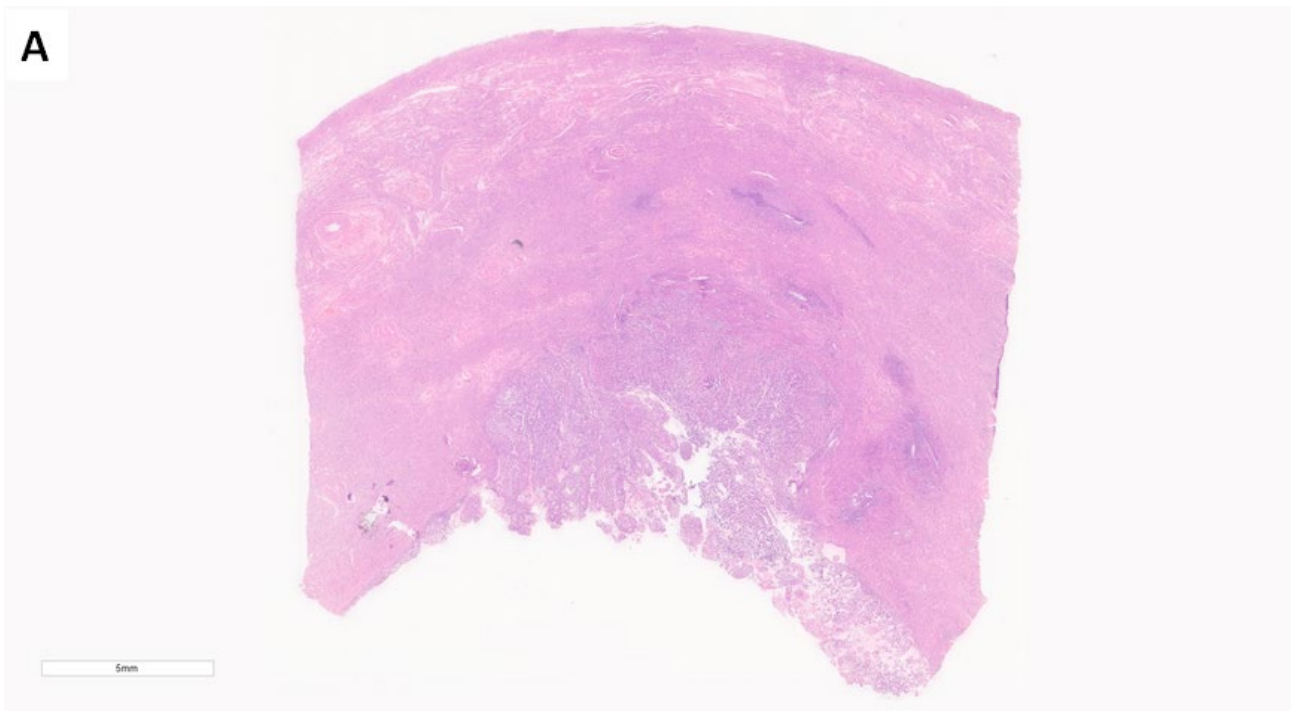
Tumor-Nekroza-Metastaza (TNM) bazirani sistem; FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) sistem određivanja stadijuma

Dubina invazije miometrijuma je bila veća od polovine debljine miometrijuma u skoro dve trećine (n=56) populacije pacijentkinja sa dijagnozom EEC, dok je u 33 slučaja EEC dubina invazije bila manja ili jednaka polovini debljine mišićnog zida uterusa (Tabela 7) (Slika 11). Prisustvo LVI, kao prognostički i potencijalni opredeljujući faktor za primenu adjuvantne terapije, uočeno je u oko jedne trećine (n=30) populacije pacijentkinja sa dijagnozom EEC (Slika 12).

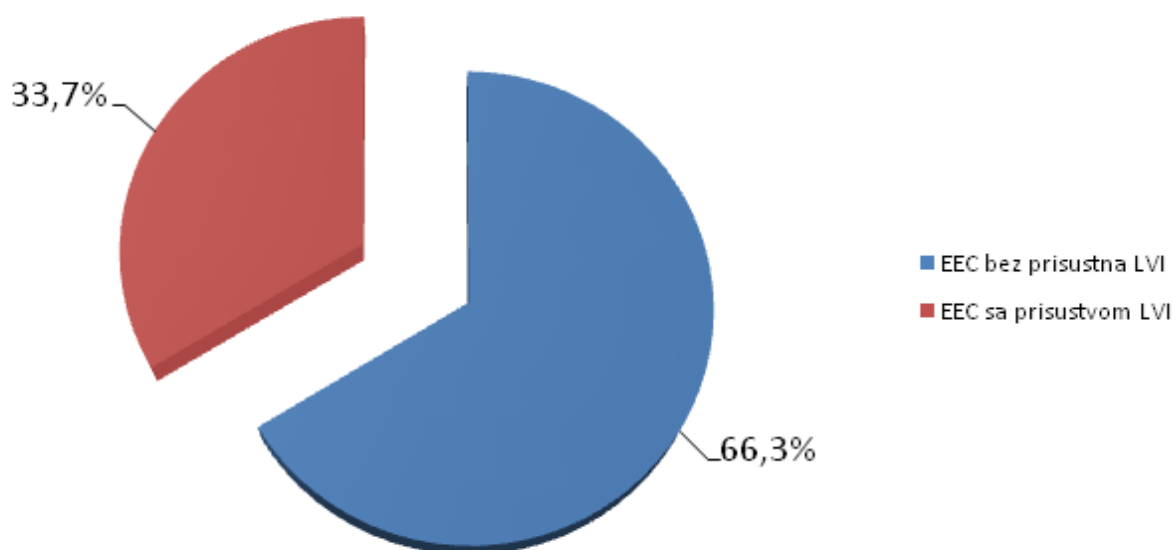
Tabela 7. Zastupljenost dubine invazije miometrijuma u uzorku endometrioidnih karcinoma endometrijuma

Endometrioidni karcinom endometrijuma n=89		
DMI (%)	≤50%	37.1 (n=33)
	>50%	62 (n=56)

Dubina invazije miometrijuma (eng. eng. *depth of myometrial invasion*, DMI) prisutna do 50% debljine miometrijuma (≤50%); veća od 50% debljine miometrijuma (>50%)



Slika 11. Dubina invazije miometrija tumorskim tkivom karcinoma endometrija manja od polovine debljine mišićnog zida uterusa A), dubina invazije u više od polovine debljine mišićnog zida uterusa B).



Slika 12. Zastupljenost limfovaskularne invazije (eng. *lymphovascular invasion*, LVI) u uzorku endometrioidnih karcinoma endometrija (eng. *endometrioid endometrial carcinoma*, EEC).

4.2. Analiza stepena unutrašnjeg slaganja dvostruko slepog analiziranja imunohistohemijskih bojenja

Analiza pouzdanosti rezultata dobijenih dvostruko slepim očitavanjem intenziteta reakcije imunohistohemijskog bojenja za FKBPL u uzorcima EEC i BEH, izvršena određivanjem Chronbach-ovog alfa koeficijenta, je pokazala visok nivo slaganja između rezultata nezavisne analize nivoa ekspresije od strane dva patologa (Tabela 8).

Tabela 8. Analiza pouzdanosti dvostruko slepog analiziranja intenziteta reakcije imunohistohemijskih bojenja za FKBPL u endometrioidnim karcinomima endometrija i benignim hiperplazijama endometrija

	Cronbach-ov alfa koeficijent	Unutrašnja konzistentnost
FKBPL (intenzitet)	0.994	Odlična

FKBPL(eng. *FK506-binding protein-like*)

Analiza pouzdanosti rezultata dobijenih dvostruko slepim očitavanjem intenziteta reakcije imunohistohemijskog bojenja za ER α u uzorcima EEC i BEH izvršena određivanjem Chronbach-ovog alfa koeficijenta je pokazala visok nivo slaganja između rezultata nezavisne analize od strane dva patologa (Tabela 9).

Tabela 9. Analiza pouzdanosti dvostruko slepog analiziranja intenziteta reakcije imunohistohemijskih bojenja za ER α u endometrioidnim karcinomima endometrijuma i benignim hiperplazijama endometrijuma

	Cronbach-ov alfa koeficijent	Unutrašnja konzistentnost
ER α (intenzitet)	0.997	Odlična

Estrogeni receptor alfa (ER α)

Pouzdanosti rezultata dobijenih dvostruko slepim očitavanjem procenta epitelnih ćelija sa pozitivnom reakcijom imunohistohemijskog bojenja za ER α u uzorcima EEC i BEH izvršena određivanjem Chronbach-ovog alfa koeficijenta je pokazala visok nivo slaganja između rezultata nezavisne analize od strane dva patologa (Tabela 10).

Tabela 10. Analiza pouzdanosti dvostruko slepog analiziranja procenta epitelnih ćelija sa pozitivnom reakcijom imunohistohemijskih bojenja za ER α u endometrioidnim karcinomima endometrijuma i benignim hiperplazijama endometrijuma

	Cronbach-ov alfa koeficijent	Unutrašnja konzistentnost
ER α (procentat)	0.987	Odlična

Estrogeni receptor alfa (ER α)

Pouzdanosti rezultata Allred-ovog skora, predstavljenog sumom skora nivoa intenziteta i skora procentualne zastupljenosti epitelnih ćelija sa pozitivnom reakcijom imunohistohemijskog bojenja za ER α u uzorcima EEC i BEH, dobijenih dvostruko slepim očitavanjem ispitivana određivanjem Chronbach-ovog alfa koeficijenta je pokazala visok nivo slaganja između rezultata nezavisne analize od strane dva patologa (Tabela 11).

Tabela 11. Analiza pouzdanosti rezultata Allred-ovog skora izračunatog prema vrednostima dobijenih dvostruko slepim analiziranjem skora nivoa intenziteta i procenta tumorskih ćelija sa pozitivnom reakcijom imunohistohemijskih bojenja za ER α u endometrioidnim karcinomima endometrijuma i benignim hiperplazijama endometrijuma

	Cronbach-ov Alfa koeficijent	Unutrašnja konzistentnost
Allred-ov skor	0.996	Odlična

Analiza pouzdanosti rezultata dobijenih dvostruko slepim očitavanjem intenziteta reakcije imunohistohemijskog bojenja za VEGF-A u uzorcima EEC i BEH izvršena određivanjem Chronbach-ovog Alfa koeficijenta je pokazala visok nivo slaganja između rezultata nezavisne anlike od strane dva patologa (Tabela 12).

Tabela 12. Analiza pouzdanosti dvostruko slepog analiziranja intenziteta reakcije imunohistohemijskih bojenja za VEGF-A u endometrioidnim karcinomima endometrijuma i benignim hiperplazijama endometrijuma

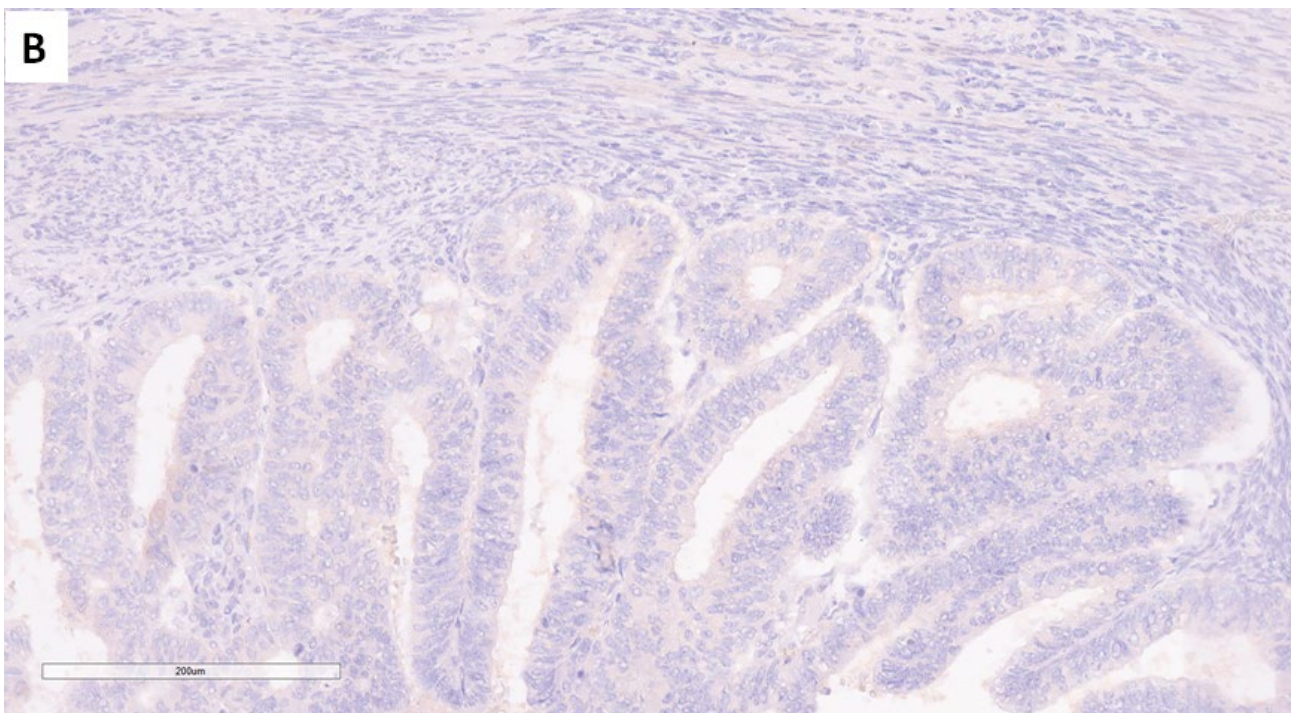
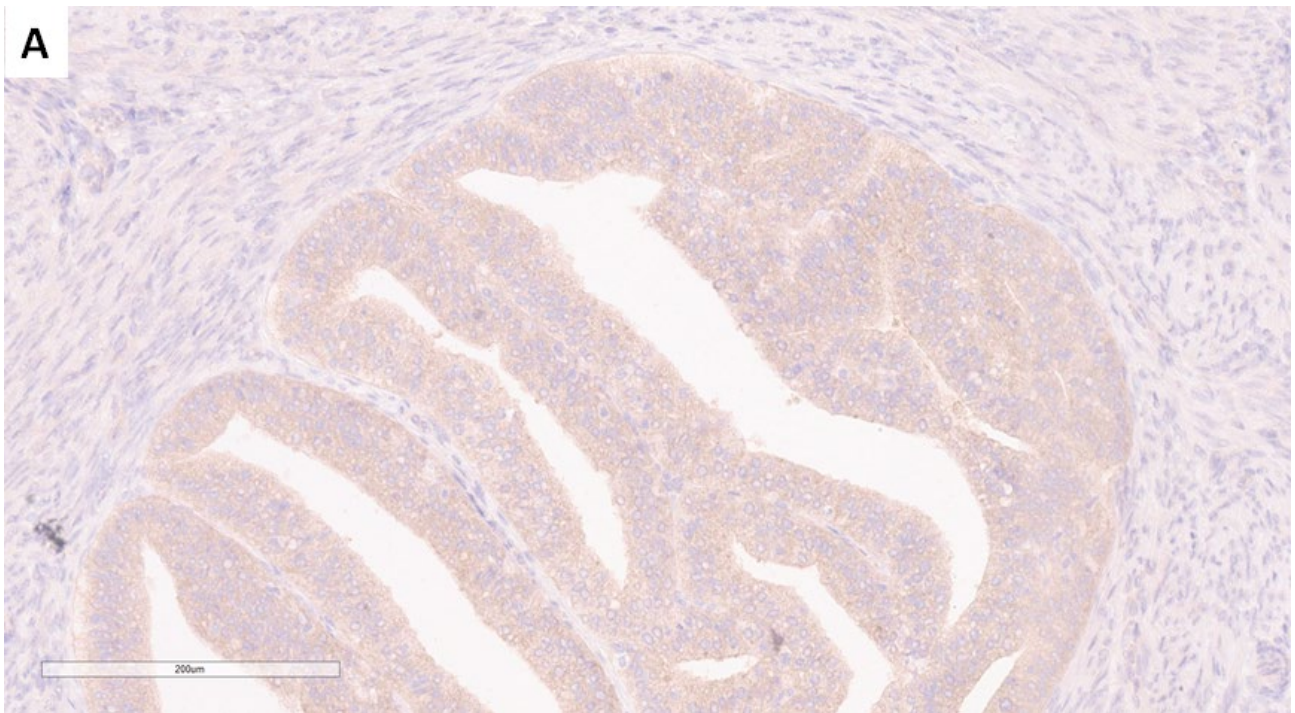
	Cronbach-ov Alfa koeficijent	Unutrašnja konzistentnost
VEGF-A (intenzitet)	0.970	Odlična

VEGF-A (eng. *vascular endothelial growth factor-A*)

4.3. Ekspresija FKBPL u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma

4.3.1. Razlika ekspresije FKBPL u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma

U grupi pacijentkinja sa karcinomima endometrijuma je uočen nizak nivo intenziteta ekspresije FKBPL. Uključujući slučajeve sa odsustvom ekspresije, kao i one koji su imali pozitivnost slabog intenziteta, 83 od 89 slučajeva je pokazalo nizak nivo intenziteta ekspresije FKBPL (Slika 13). U retkim slučajevima je uočen umeren intenzitet ekspresije (n=6). U grupi slučajeva EEC nije uočen visok intenzitet imunohistohemijske ekspresije FKBPL (Tabela 13).



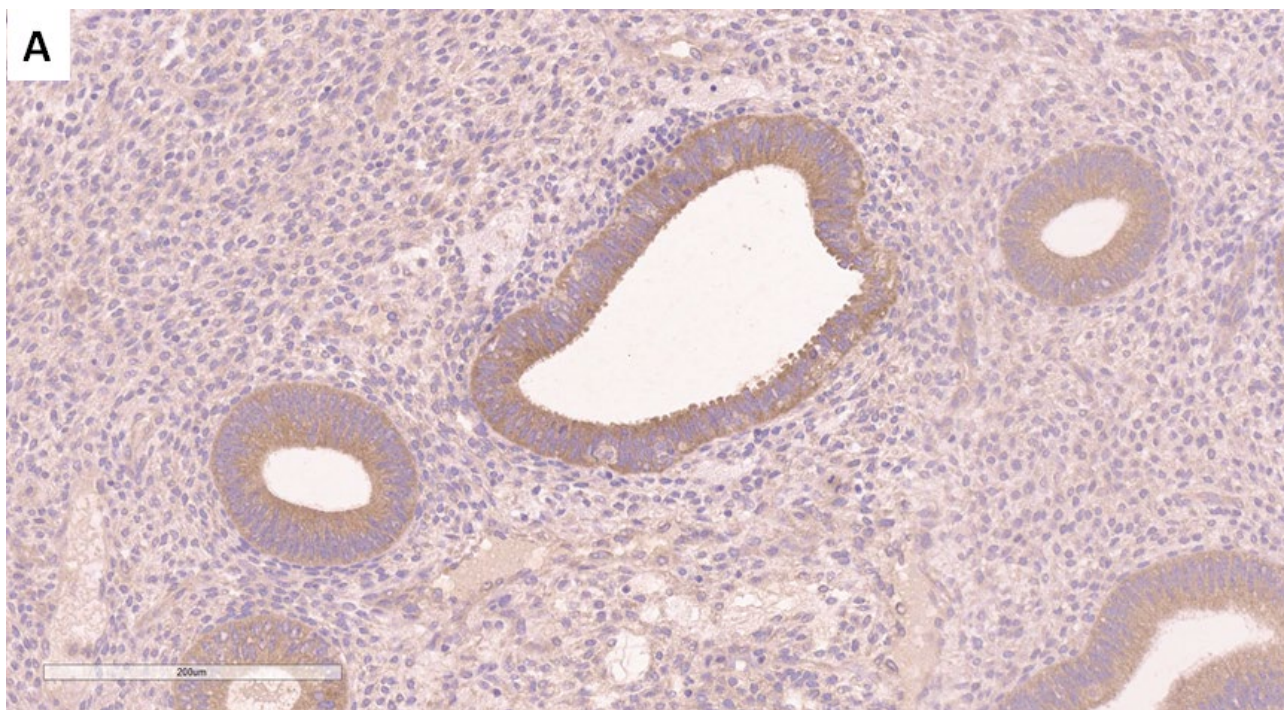
Slika 13. Ekspresija FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*) A) niskog intenziteta i B) odsustvo ekspresije FKBPL u tkivu endometrioidnog karcinoma endometrijuma, FKBPL x200

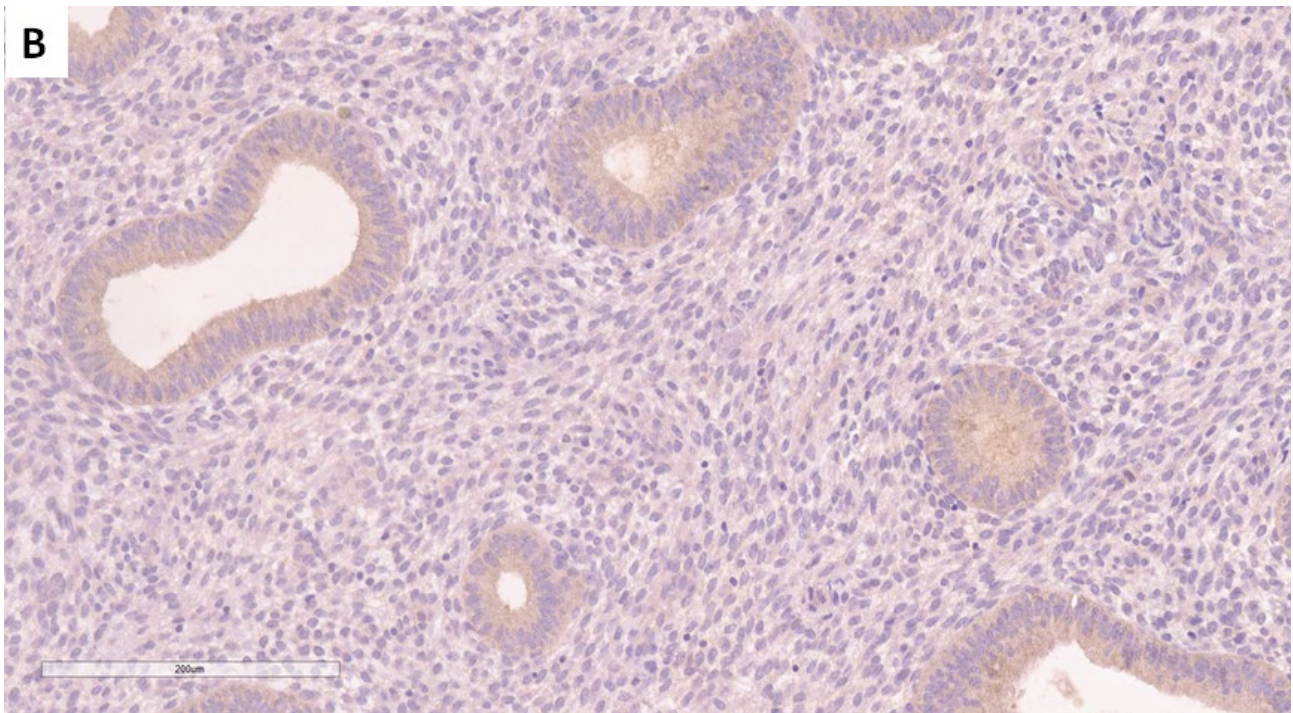
Tabela 13. Intenzitet ekspresije FKBPL u endometrioidnom karcinomu endometrijuma

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	44	49.4
1	39	43.8
2	6	6.7
3	0	0
Ukupno	89	100

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*)

Nasuprot ovim rezultatima u grupi pacijentkinja sa hiperplazijom endometrijuma je uočen umeren i visok nivo ekspresije FKBPL u 39 od 40 slučajeva (Slika 14), dok je samo u jednom slučaju BEH uočena ekspresija slabog intenziteta (Tabela 14).





Slika 14. Ekspresija FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*) A) visokog intenziteta i B) srednjeg intenziteta u benignoj hiperplaziji endometrijuma, FKBPL x200

Tabela 14. Intenzitet ekspresije FKBPL u benignoj hiperplaziji endometrijuma

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	0	0
1	1	2.5
2	14	35
3	25	62.5
Ukupno	40	100

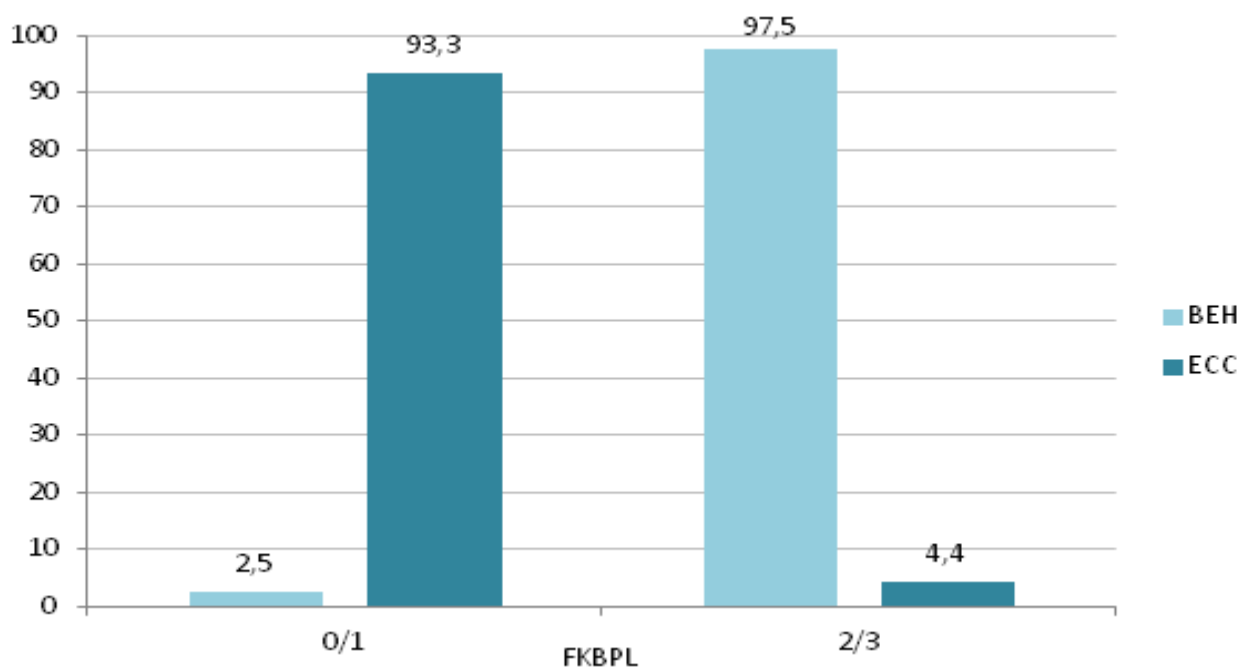
FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*)

Postojala je značajna razlika u ekspresiji FKBPL između EEC i BEH ($p < 0,001$), koja jasno ukazuje na smanjenje intenziteta i gubitak ekspresije unutar tkiva sa malignim promenama endometrijuma (Tabela 15) (Slika 15).

Tabela 15. Ekspresija FKBPL u endometrioidnim karcinomima i benignoj hiperplaziji endometrijuma

		BEH	EEC	Značajnost
		n=40	n=89	(p)
FKBPL	0/1	2.5% (n=1)	93.3% (n=83)	<0.001
	2/3	97.5% (n=39)	6.7% (n=6)	

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)



Slika 15. Ekspresija FKBPL u endometrioidnim karcinomima i benignoj hiperplaziji endometrijuma

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)

4.3.2. Analiza dijagnostičke tačnosti ekspresije FKBPL

Imunohistohemijska analiza je pokazala umeren do visok intenzitet ekspresije FKBPL u 97,5% (n=39) uzoraka BEH, a nizak intenzitet ili odsustvo ekspresije u 93,3% (n=83) slučajeva EEC. FKBPL bojenje je pokazalo visoku pozitivnu prediktivnu vrednost (98,8%) i visoku negativnu prediktivnu vrednost za malignu dijagnozu (86,7%) (Tabela 16).

Tabela 16. Mere dijagnostičke tačnosti ekspresije FKBPL

	Senzitivnost	PPV	Specifičnost	NPV	Preciznost
FKBPL	93.3%	98.8%	97.5%	86.7%	94.6%

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); pozitivna prediktivna vrednost (PPV); negativna prediktivna vrednost (NPV)

4.3.3. Korelacija ekspresije FKBPL sa analiziranim prognostičkim faktorima

4.3.3.1. Korelacija ekspresije FKBPL sa tumorskim gradusom

U grupi EEC-a FIGO gradusa 1 uočen je gubitak ekspresije u 18 od 36 slučajeva. Slični rezultati su uočeni u grupi EEC-a sa višim histološkim gradusom među kojima u 26 od 53 slučaja nije bilo imunohistohemijske ekspresije FKBPL (Tabela 17-18).

Tabela 17. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomu endometrijuma FIGO gradusa 1

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	18	50
1	15	41.7
2	3	8.3
3	0	0
Ukupno	36	100

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)

Tabela 18. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomu endometrijuma FIGO gradusa 2 i 3

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	26	49.1
1	24	45.3
2	3	5.7
3	0	0
Ukupno	53	100

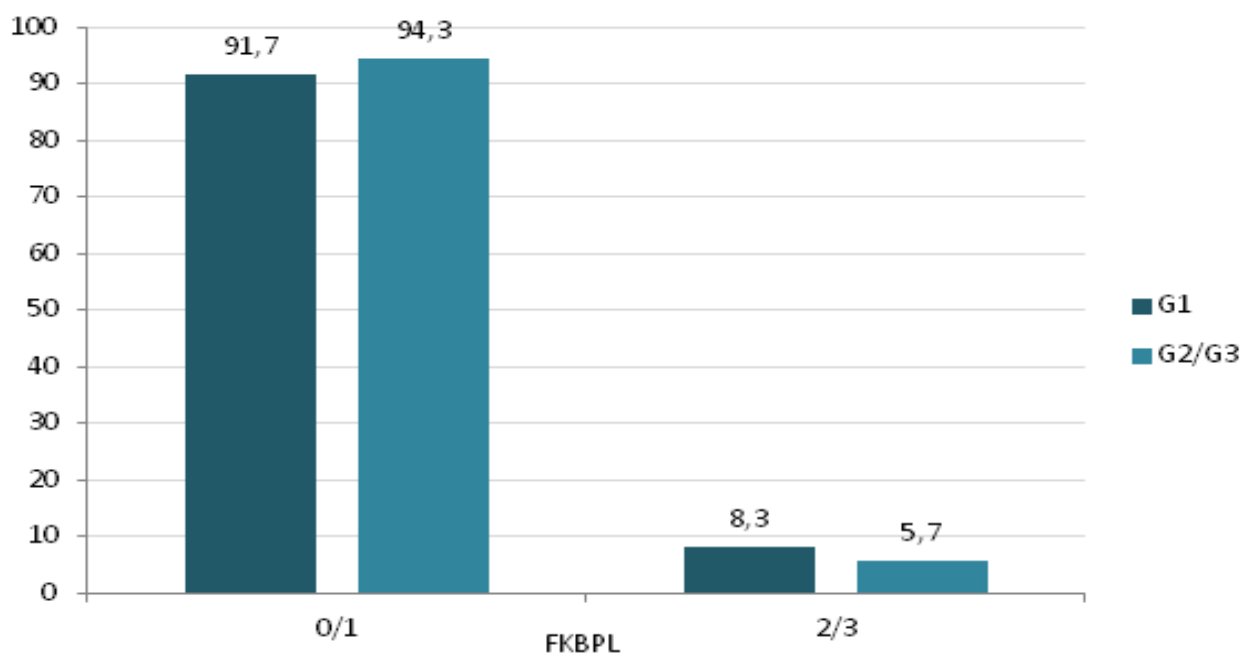
FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)

Nije pronađena značajna povezanost ($p=0.622$) intenziteta ekspresije FKBPL sa histološkim gradusom tumora (Tabela 19) (Slika 16.).

Tabela 19. Korelacija ekspresije FKBPL sa histološkim gradusom karcinoma endometrija

		G1	G2/G3	Značajnost (p)
FKBPL	0/1	91.7% (n=33)	94.3% (n=50)	0.622
	2/3	8.3% (n=3)	5.7% (n=3)	

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); G1,G2, i G3 (gradus 1,2, i 3)



Slika 16. Korelacija ekspresije FKBPL sa histološkim gradusom karcinoma endometrija

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); G1,G2, i G3 (gradus 1,2, i 3)

4.3.3.2. Korelacija ekspresije FKBPL sa stadijumom bolesti

U grupi EEC-a TNM stadijuma T1a uočen je gubitak ekspresije u 16 od 30 slučajeva. Slični rezultati su uočeni u grupi EEC-a viših stadijuma, među kojima u 26 od 53 slučajeva u stadijumu u 1b, 10 od 18 slučajeva u stadijumu 2, i u 4 od 9 slučajeva u stadijumu 3, nije bilo imunohistohemijske ekspresije FKBPL (Tabela 20-23).

Tabela 20. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomu endometrijuma TNM stadijuma T1a

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	16	53.3
1	10	33.3
2	4	13.3
3	0	0
Ukupno	30	100

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); Tumor-Nekroza-Metastaza (TNM) bazirani sistem

Tabela 21. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomu endometrijuma TNM stadijuma T1b

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	14	43.8
1	17	53.1
2	1	3.1
3	0	0
Ukupno	32	100

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); Tumor-Nekroza-Metastaza (TNM) bazirani sistem

Tabela 22. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomu endometrijuma TNM stadijuma T2

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	10	55.6
1	7	38.9
2	1	5.6
3	0	0
Ukupno	18	100

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); Tumor-Nekroza-Metastaza (TNM) bazirani sistem

Tabela 23. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomu endometrijuma TNM stadijuma T3

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	4	44.4
1	5	55.6
2	0	0
3	0	0
Ukupno	9	100

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); Tumor-Nekroza-Metastaza (TNM) bazirani sistem

Nije pronađena statistički značajna povezanost ($Rho=0.019$; $p>0.005$) intenziteta ekspresije FKBPL sa TNM stadijumom tumora.

U grupi EEC-a FIGO stadijuma IA uočen je gubitak ekspresije u 14 od 28 slučajeva. Slični rezultati su uočeni u grupi EEC-a viših stadijuma, među kojima u 15 od 32 slučajeva u stadijumu u IB, 10 od 18 slučajeva u stadijumu II, i u 5 od 10 slučajeva u stadijumu III, nije bilo imunohistochemijske ekspresije FKBPL (Tabela 24-27). Jedini slučaj EEC u našem uzorku koji je pripadao FIGO stadijumu IV je imao umeren intenzitet ekspresije FKBPL.

Tabela 24. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomu endometrijuma FIGO stadijuma IA

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	14	50
1	10	35.7
2	4	14.3
3	0	0
Ukupno	28	100

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) sistem

Tabela 25. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomu endometrijuma FIGO stadijuma IB

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	15	46.9
1	16	50
2	1	3.1
3	0	0
Ukupno	32	100

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) sistem

Tabela 26. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomu endometrijuma FIGO stadijuma II

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	10	55.6
1	7	38.9
2	1	5.6
3	0	0
Ukupno	18	100

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) sistem

Tabela 27. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomu endometrijuma FIGO stadijuma III

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	5	50
1	5	50
2	0	0
3	0	0
Ukupno	10	100

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) sistem

Nije pronađena statistički značajna povezanost ($Rho=0.047$; $p>0.005$) intenziteta ekspresije FKBPL sa FIGO stadijumom tumora

4.3.3.3. Korelacija ekspresije FKBPL sa dubinom invazije miometrijuma

U grupi EEC-a sa dubinom invazije $<50\%$ debljine miometrijuma uočen je gubitak ekspresije u 17 od 33 slučajeva, dok je u grupi EEC-a sa dubinom invazije $\geq 50\%$ debljine miometrijuma u 54 od 56 slučajeva nije bilo imunohistohemijske ekspresije FKBPL (Tabela 28-29).

Tabela 28. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomima endometrijuma sa DMI $<50\%$

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	17	51.5
1	12	36.4
2	4	12.1
3	0	0
Ukupno	33	100

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); DMI (eng. *depth of myometrial invasion*)

Tabela 29. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomima endometrijuma sa DMI $\geq 50\%$

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	27	48.2
1	27	48.2
2	2	3.6
3	0	0
Ukupno	56	100

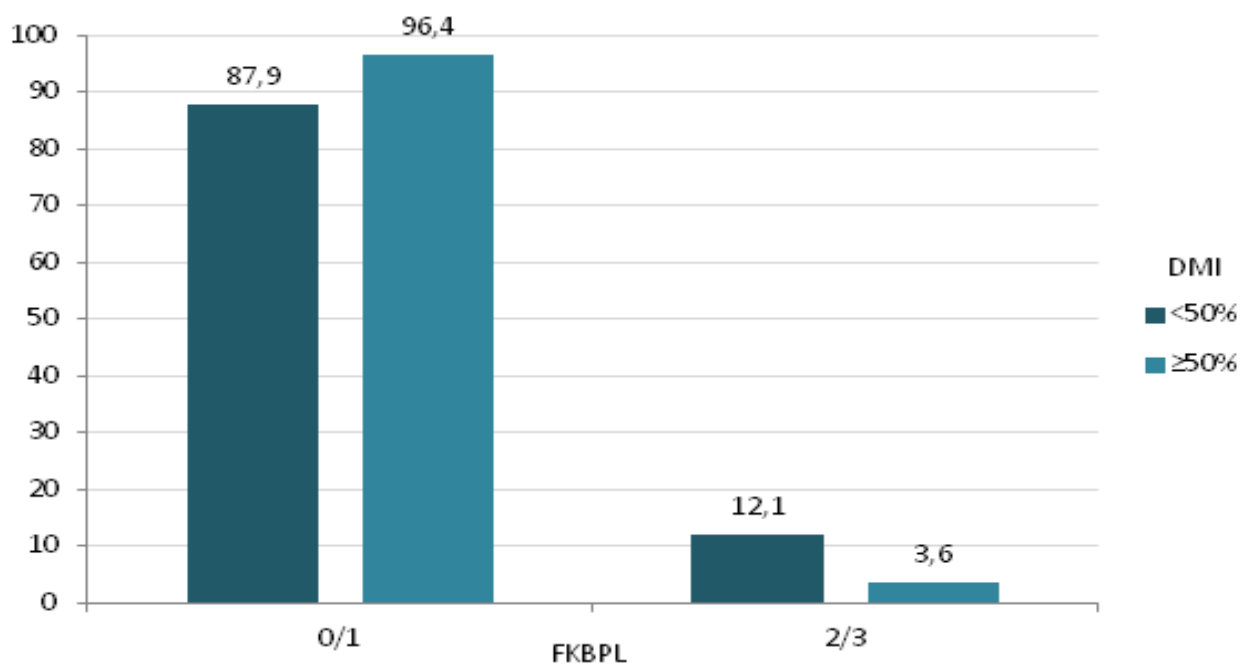
FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); DMI (eng. *depth of myometrial invasion*)

Nije pronađena značajna povezanost ($p>0.05$) intenziteta ekspresije FKBPL sa DMI (Tabela 30) (Slika 17).

Tabela 30. Korelacija ekspresije FKBPL sa dubinom invazije miometrijuma

		<50%	≥50%	Značajnost (p)
FKBPL	0/1	87.9% (n=39)	96.4% (n=54)	>0.05
	2/3	12.1% (n=4)	3.6% (n=2)	

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*);



Slika 17. Korelacija ekspresije FKBPL sa dubinom invazije miometrijuma

DMI (eng. *depth of myometrial invasion*); ($\leq 50\%$) dubina invazije prisutna do 50% debljine miometrijuma; ($>50\%$) više od 50% debljine miometrijuma

4.3.3.4. Korelacija ekspresije FKBPL sa prisustvom limfovaskularne invazije

U grupi EEC-a bez prisustva LVI uočen je gubitak ekspresije u 29 od 59 slučajeva, dok je u grupi EEC-a sa prisustvom LVI u 15 od 30 slučajeva nije bilo imunohistohemijske ekspresije FKBPL (Tabela 31-32).

Tabela 31. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomima endometrijuma bez LVI

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	29	49.2
1	25	42.4
2	5	8.5
3	0	0
Ukupno	59	100

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); LVI (eng. *lymphovascular invasion*)

Tabela 32. Intenzitet ekspresije FKBPL u karcinomima endometrijuma sa LVI

Intenzitet ekspresije FKBPL	Učestalost	Procenat
0	15	50
1	14	46.7
2	1	3.3
3	0	0
Ukupno	30	100

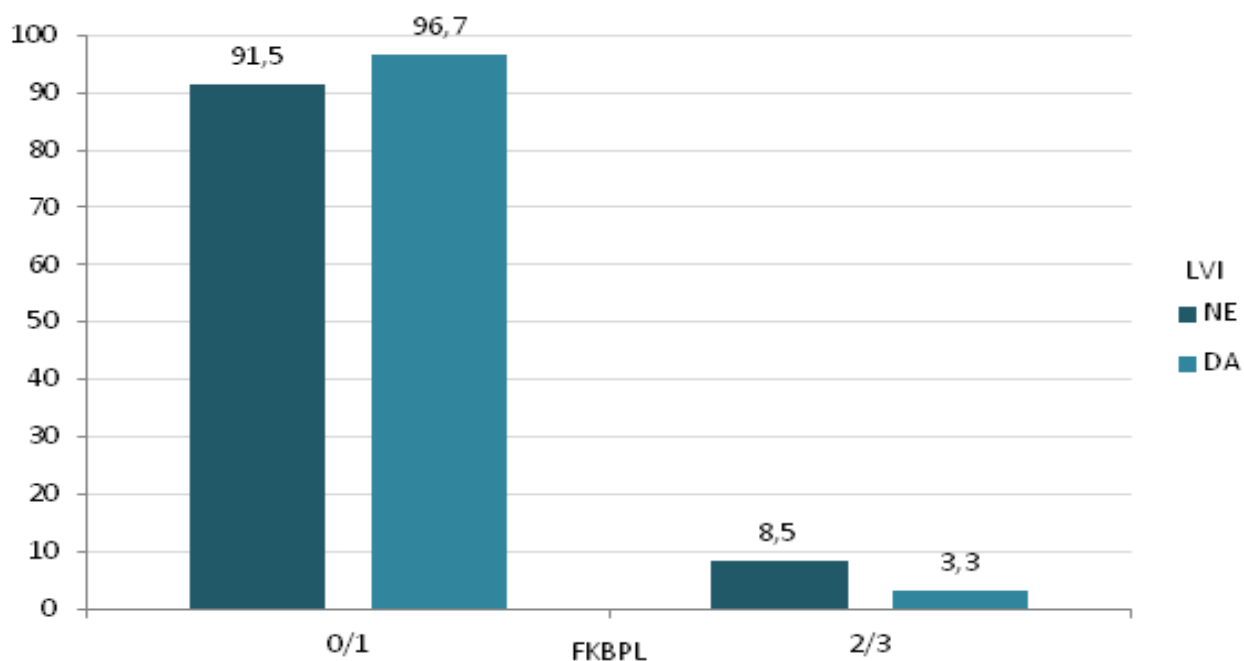
FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); LVI (eng. *lymphovascular invasion*)

Nije pronađena značajna povezanost ($p > 0.05$) intenziteta ekspresije FKBPL sa prisustvom LVI (Tabela 33) (Slika 18).

Tabela 33. Korelacija ekspresije FKBPL sa prisustvom LVI

		Ne	Da	Značajnost (p)
FKBPL	0/1	91.5% (n=54)	96.7% (n=29)	>0.05
	2/3	8.5% (n=5)	3.3% (n=1)	

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); LVI (eng. *lymphovascular invasion*)



Slika 18. Korelacija ekspresije FKBPL sa prisustvom limfovaskularne invazije FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); LVI (eng. *lymphovascular invasion*)

4.3.4. Validacija metode za morfometrijsku analizu ekspresije FKBPL

Morfometrijski metod kvantifikacije intenziteta imunohistohemijske reakcije antitela kojim se intenzitet pozitivnosti predstavlja kroz procenat površine regije od interesa se pokazao neadekvatim usled specifičnosti imunohistohemijske reakcije antitela FKBPL. Obzirom da se FKBPL pozitivna imunohistohemijska reakcija javlja u svim epitelnim ćelijama endometrijuma jednako, u toku procesa validacije, ovom metodom su dobijene vrednosti 100% pokrivenosti površine žlezdanog epitela pozitivnim signalom hromogena, kao analizirane regije od interesa, na svim preparatima gde je pozitivna imunohistohemijska reakcija na FKBPL bila prisutna, bez razlike između slučajeva koji su prethodnom analizom svetlosnim mikroskopom utvrđeni slab, umeren i jak intenzitet imunohistohemijske reakcije. Naš zaključak je bio da se kvantifikacija intenziteta imunohistohemijske reakcije FKBPL ne može adekvatno izvršiti ovom metodom, zato što promena intenziteta pozitivnosti FKBPL ne pokazuje varijacije u distribuciji, već su rezlike u intenzitetu vidljive kao promene u svetlosnom spektru hromogena.

4.4. Ekspresija ER α u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma

4.4.1. Intenzitet ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma

Pozitivnost ER α je u uzorcima EEC bila niskog intenziteta kod 46,1% slučajeva, umerenog intenziteta kod 26,95% (n=24), a visokog intenziteta kod 26,95% (n=24) (Tabela 34).

Tabela 34. Intenzitet ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometrijuma

Intenzitet ekspresije ER α	Učestalost	Procenat
0	0	0
1	41	46.1
2	24	27.0
3	24	27.0
Ukupno	89	100

Estrogeni receptor alfa (ER α)

U svim uzorcima BEH ekspresija ER α je bila umerenog do visokog intenziteta (Tabela 35). Komplementarno ovom nalazu, visoke vrednosti za Allred-ovog skora su bile prisutne u 90% (n=36) slučajeva BEH.

Tabela 35. Intenzitet ekspresije ER α u benignoj hiperplaziji endometrijuma

Intenzitet ekspresije ER α	Učestalost	Procenat
0	0	0
1	0	0
2	7	17.5
3	33	82.5
Ukupno	40	100

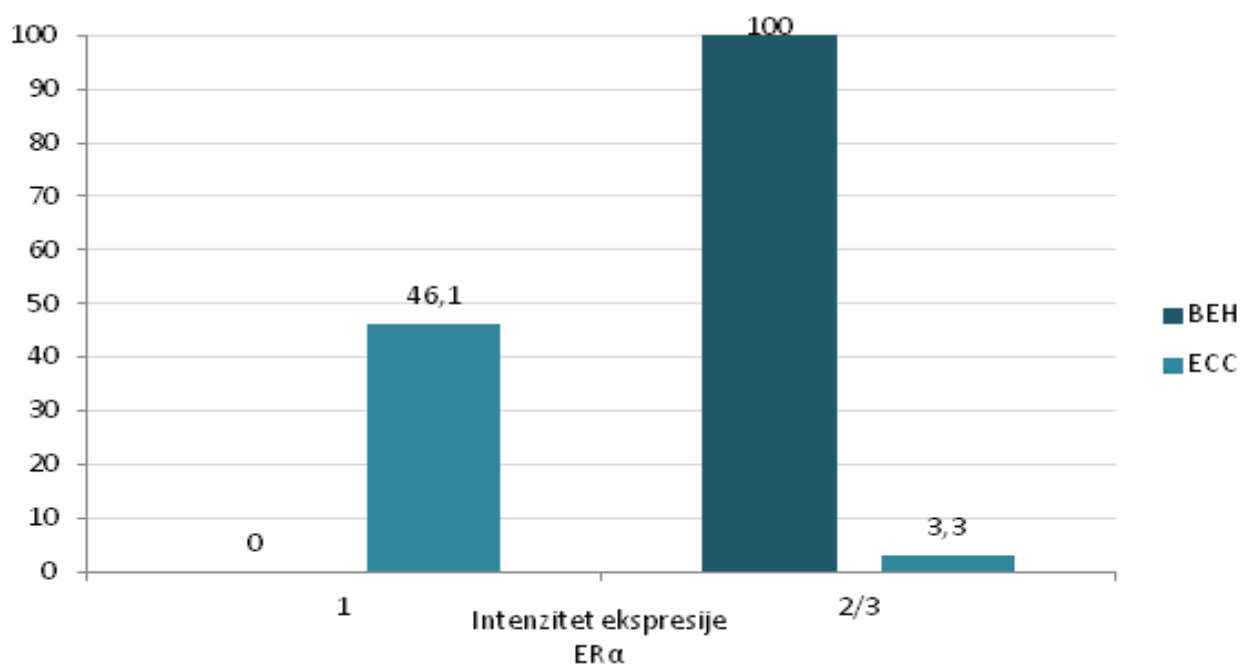
Estrogeni receptor alfa (ER α)

Postojala je značajna razlika u intenzitetu ekspresije ER α između EEC i BEH ($p < 0,001$), koja jasno ukazuje na smanjenje intenziteta ekspresije unutar tkiva sa malignim promenama endometrijuma (Tabela 36) (Slika 19).

Tabela 36. Razlika intenziteta ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma

Intenzitet ekspresije ER α	Vrednosti	BEH n=40	EEC n=89	Značajnost (p)
	1		0% (n=0)	46.1% (n=41)
2/3		100% (n=40)	53.9% (n=48)	

Estrogeni receptor alfa (ER α); BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)



Slika 19. Razlika intenzitet ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma

Estrogeni receptor alfa (ER α); BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)

4.4.2. Procentualna zastupljenost ER α pozitivnih ćelija endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma

U grupi pacijenata sa EEC, 78,7% (n=70) je pokazalo ekspresiju ER α u manje od 66% tumorskih žlezda, dok je 21,3% (n=19) pokazalo pozitivnu reakciju u preko 67% tumorskih žlezda (Tabela 37).

Tabela 37. Procentualna zastupljenost ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometrijuma

Procentualna zastupljenost ekspresije ER α	Učestalost	Procenat
0	0	0
1	1	1.1
2	2	2.2
3	46	51.7
4	21	23.6
5	19	21.3
Ukupno	89	100

Estrogeni receptor alfa (ER α)

Visoka procentualna zastupljenost ekspresije ER α je bila prisutna slučajevima BEH, među kojima je 32 od 40 uzoraka hiperplazije endometrijuma pokazalo pozitivnost u više od 66% epitelnih ćelija. Ni u jednom uzorku BEH procenat ER α pozitivnih epitelnih ćelija nije bio manji od 34% (Tabela 38).

Tabela 38. Procentualna zastupljenost ekspresije ER α u benignoj hiperplaziji endometrijuma

Procentualna zastupljenost ekspresije ER α	Učestalost	Procenat
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	8	20
5	32	80
Ukupno	40	100

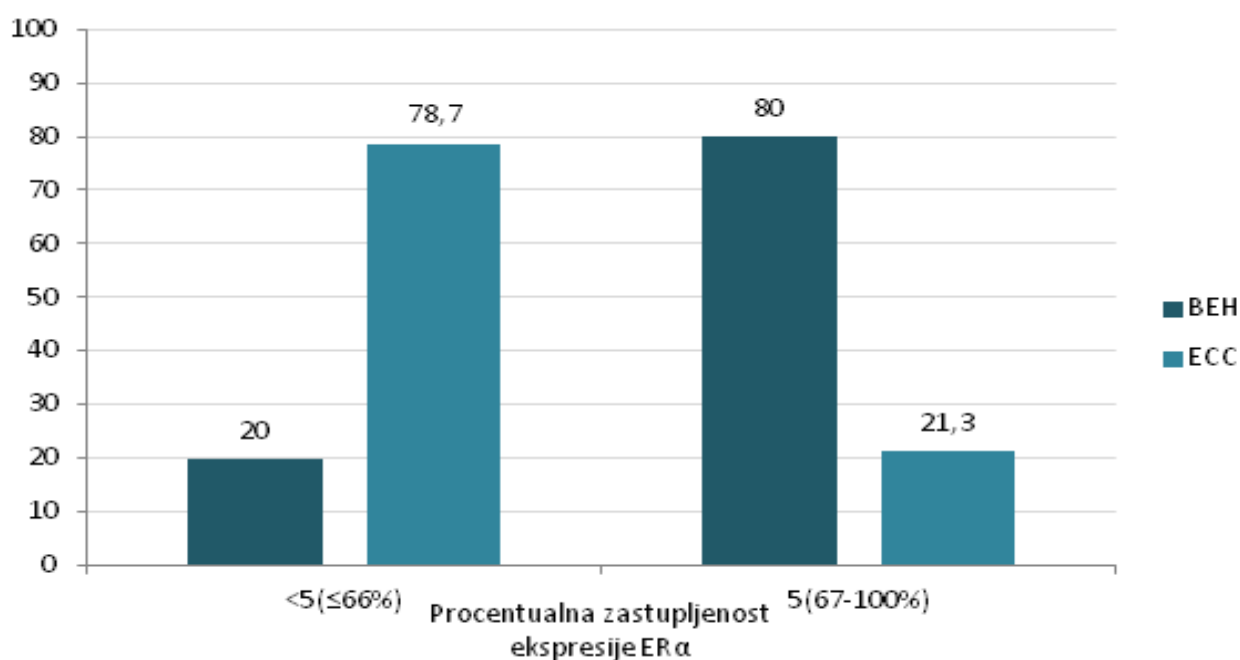
Estrogeni receptor alfa (ER α)

Postojala je značajna razlika u procentualnoj zastupljenosti ekspresije ER α između EEC i BEH ($p < 0,001$), koja jasno ukazuje na smanjenje intenziteta ekspresije unutar tkiva sa malignim promenama endometrijuma (Tabela 39) (Slika 20).

Tabela 39. Razlika procentualne zastupljenosti ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometrija i benignoj hiperplaziji endometrija

Procentualna zastupljenost ekspresije ER α	Vrednosti	BEH n=40	EEC n=89	Značajnost (p)
	<5(\leq 66%)		20.0 (n=8)	78.7% (n=70)
5(67-100%)		80.0 (n=32)	21.3% (n=19)	

Estrogeni receptor alfa (ER α); BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)



Slika 20. Razlika procentualne zastupljenosti ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometrija i benignoj hiperplaziji endometrija

Estrogeni receptor alfa (ER α); BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)

4.4.3. Nivo ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometrija i benignoj hiperplaziji endometrija određen Allred-ovim skorom

Visoke vrednosti Allred skora uočene su kod 28,1% (n=25), dok su umerene vrednosti skora primećene u 68,6% (n=61) EEC uzoraka, dok je 2,2% (n=2) pokazalo niske vrednosti skora (Tabela 40).

Tabela 40. Nivo ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometrijuma određen Allred-ovim skorom

Allred-ov skor	Učestalost	Procenat
0	0	0
1	0	0
2	1	1.1
3	2	2.2
4	35	39.3
5	19	12.4
6	15	16.9
7	8	9
8	17	19.1
Ukupno	89	100

Visoke vrednosti Allred-ovog skora su uočene u slučajevima BEH, među kojima je 90% uzoraka hiperplazije endometrijuma imalo skor 4 ili 5. Ni u jednom uzorku BEH vrednosti Allred-ovog skora nisu odgovarale vrednostima niskog intenziteta (Tabela 41).

Tabela 41. Nivo ekspresije ER α u benignoj hiperplaziji endometrijuma određen Allred-ovim skorom

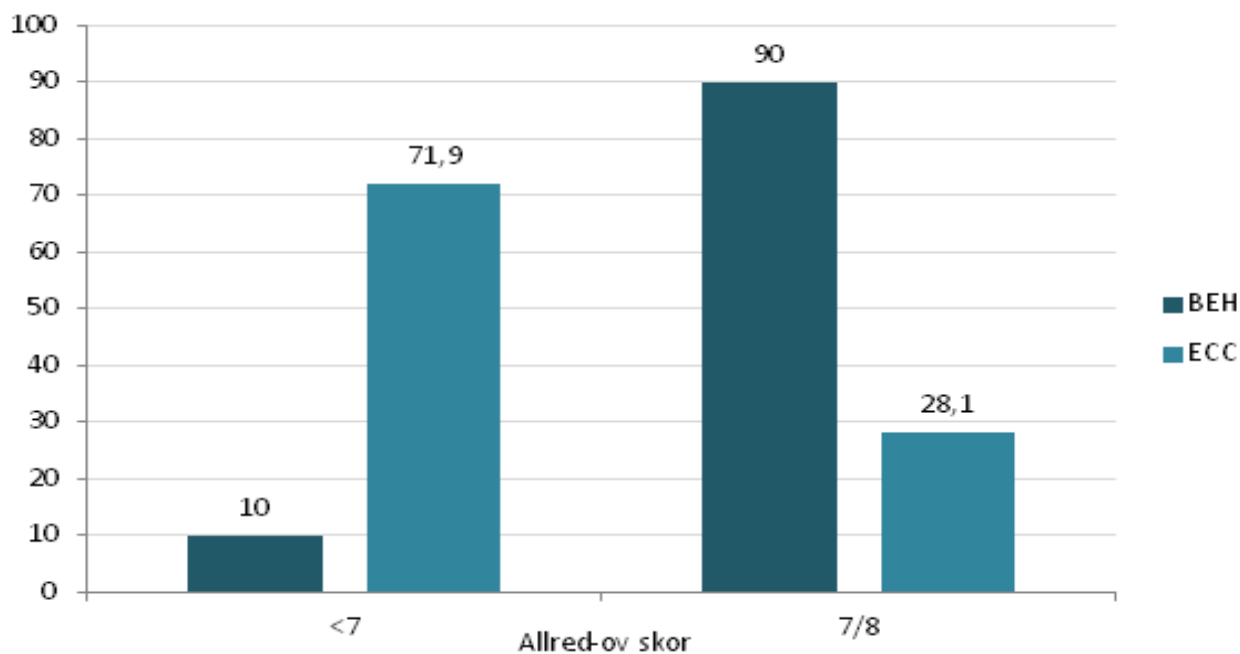
Allred-ov skor	Učestalost	Procenat
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	4	10
7	7	17.5
8	29	72.5
Ukupno	40	100

Postojala je značajna razlika u nivo ekspresije ER α određenog Allred-ovim skorom između EEC i BEH ($p < 0,001$), koja jasno ukazuje na smanjenje intenziteta ekspresije unutar tkiva sa malignim promenama endometrijuma (Tabela 42) (Slika 21).

Tabela 42. Razlika nivoa ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometriijuma i benignoj hiperplaziji endometriijuma određenog Allred-ovim skorom

Allred-ov skor	Vrednosti	BEH n=40	EEC n=89	Značajnost (p)
	<7		10% (n=4)	71.9% (n=64)*
7/8		90% (n=36)	28.1% (n=25)	

Estrogeni receptor alfa (ER α); BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)



Slika 21. Razlika nivoa ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu endometriijuma i benignoj hiperplaziji endometriijuma određenog Allred-ovim skorom

Estrogeni receptor alfa (ER α); BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)

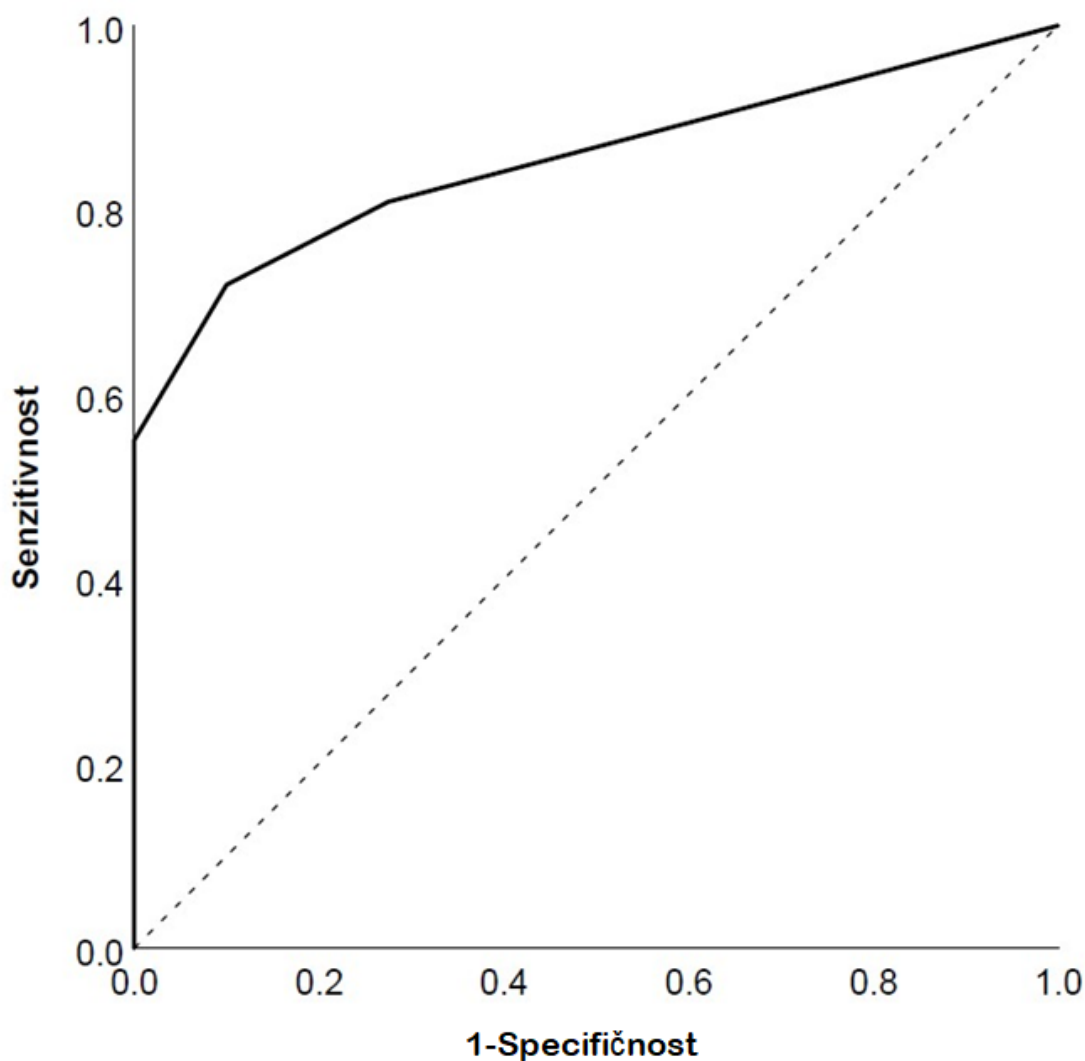
Medijana vrednosti Allred-ovog skora je bila 8 u uzorcima BEH, a vrednosti u grupi sa dijagnozom EEC medijana je bila 5 (Tabela 43).

Tabela 43. Deskriptivne statističke mere vrednosti Allred-ovog skora u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoј hiperplaziji endometrijuma

Allred-ov skor	BEH			EEC		
	Medijana	Minimum	Maksimum	Medijana	Minimum	Maksimum
	P1	8	6	8	5	2
P2	8	6	8	5	2	8

BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*); P1 i P2 (patolog 1 i 2)

Nađena je statistički značajna razlika ($Z=6.637$, $p<0.001$) u vrednostima Allred-ovog skora između grupe EEC i BEH (Tabela 43). Analizom dijagnostičke preciznosti razlike vrednosti Allred-ovog skora između EEC i BEH najviša specifičnost, senzitivnost i najviše prediktivne vrednosti su uočene za graničnu vrednost (eng. *cut-off value*) 7 Allred-ovog skora (Tabela 44, 45 i Slika 22).



Slika 22. Površina ispod krive Allred-ov skor u diferencijalnoj dijagnozi između endometrioidnog karcinoma i benigne hiperplazije endometrijuma.

Tabela 44. Površina ispod krive za nivo dijagnostičke preciznosti razlike vrednosti Allred-ovog skora između EEC i BEH izmerenih od strane patologa 1.

	Površina ispod krive	Standardna greška	Značajnost
Allred-ov skor	0.853	0.032	<0.001

Tabela 45. Mere dijagnostičke preciznosti razlike vrednosti Allred-ovog skora između EEC i BEH od strane patologa 1.

Cut-off	Senzitivnost	PPV	Specifičnost	NPV
≥7	71.9%	94.1%	90%	59%

Granična vrednost (eng. *Cut-off value*); pozitivna prediktivna vrednost (PPV); negativna prediktivna vrednost (NPV)

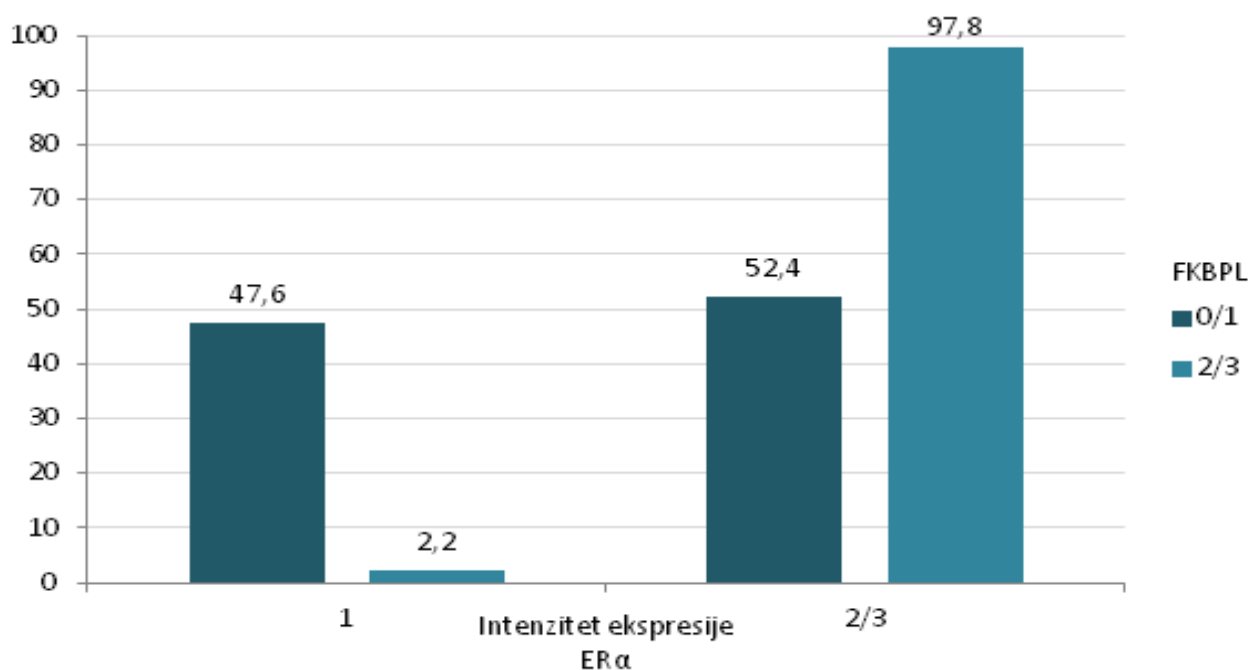
4.4.4. Korelacija ekspresije FKBPL i ER α

Intenzitet ekspresije FKBPL, posmatran na kompletnom setu uzoraka pacijenata sa BEH i EEC, bio je u umereno pozitivnoj korelaciji ($p < 0,05$) sa parametrima ekspresije ER α (intenzitet, procenat i visoke vrednosti Allred-ovog skora) (Tabela 46-48) (Slika 23-25).

Tabela 46. Korelacija intenziteta ekspresije ER α sa intenzitetom ekspresije FKBPL u celokupnom uzorku

	Vrednosti	FKBPL		Značajnost
		0/1	2/3	
Intenzitet ekspresije ER α	1	47.6 (n=40)	2.2 (n=1)	<0,05
	2/3	52.4 (n=44)	97.8 (n=44)	

Estrogeni receptor alfa (ER α); FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*)



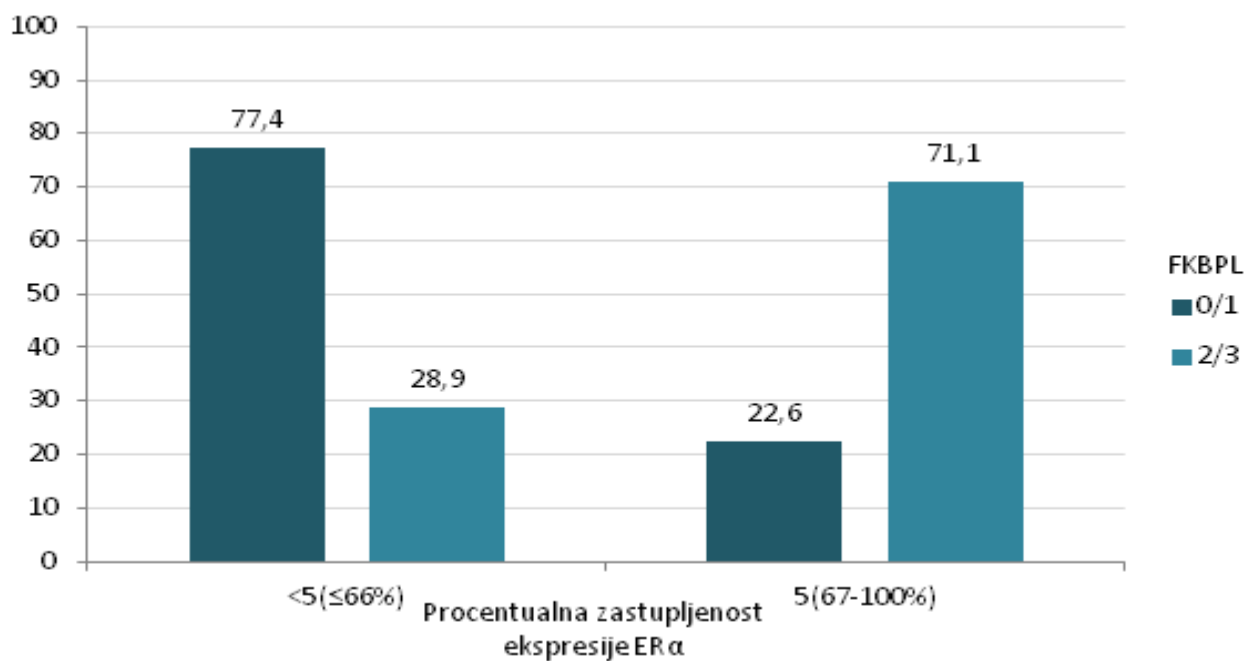
Slika 23. Korelacija intenziteta ekspresije ER α sa intenzitetom ekspresije FKBPL u celokupnom uzorku

Estrogeni receptor alfa (ER α); FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*)

Tabela 47. Korelacija procentualne zastupljenosti ekspresije ER α sa intenzitetom ekspresije FKBPL u celokupnom uzorku

	Vrednosti	FKBPL		Značajnost
		0/1	2/3	
Procentualna zastupljenost ekspresije ER α	<5(\leq 66%)	77.4 (n=65)	28.9 (n=13)	<0,05
	5(67-100%)	22.6 (n=19)	71.1 (n=32)	

Estrogeni receptor alfa (ER α); FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*)



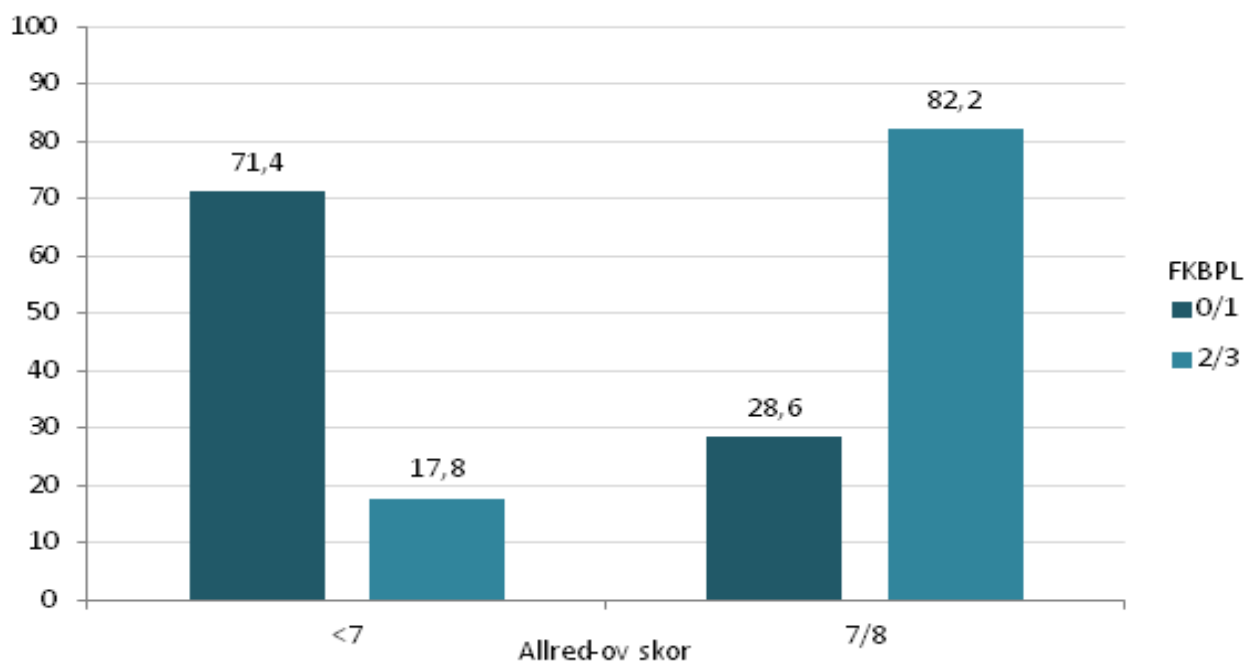
Slika 24. Korelacija procentualne zastupljenosti ekspresije ER α sa intenzitetom ekspresije FKBPL u celokupnom uzorku

Estrogeni receptor alfa (ER α); FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*)

Tabela 48. Korelacija nivoa ekspresije ER α određenog Allred-ovim skorom sa intenzitetom ekspresije FKBPL u celokupnom uzorku

	Vrednosti	FKBPL		Značajnost
		0/1	2/3	
Allred-ov skor	<7	71.4 (n=60)	17.8 (n=8)	<0,05
	7/8	28.6 (n=24)	82.2 (n=37)	

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*)



Slika 25. Korelacija nivoa ekspresije ER α određenog Allred-ovim skorom sa intenzitetom ekspresije FKBPL u celokupnom uzorku

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*)

Allred-ov skor je pokazao najjaču korelaciju sa intenzitetom ekspresije FKBPL u celokupnom uzorku.

4.4.5. Korelacija ekspresije ER α sa tumorskim gradusom

U grupi EEC-a FIGO gradusa 1 uočena je relativno ujednačena distribucija slučajeva sa slabim, umerenim i jakim intenzitetom ekspresije ER α , dok je u grupi EEC sa višim histološkim gradusom približno jednaka bila zastupljenost slučajeva sa slabim u odnosu na zastupljenost slučajeva sa intenzitetom ekspresije umerenog i jakog intenziteta imunohistohemijske ekspresije ER α (Tabela 49-50).

Tabela 49. Intenzitet ekspresije ER α u karcinomu endometrijuma FIGO gradusa 1

Intenzitet ekspresije ER α	Učestalost	Procenat
0	0	0
1	13	36.1
2	11	30.6
3	12	33.3
Ukupno	36	100

Estrogeni receptor alfa (ER α); FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)

Tabela 50. Intenzitet ekspresije ER α u karcinomu endometrija FIGO gradusa 2 i 3

Intenzitet ekspresije ER α	Učestalost	Procenat
0	0	0
1	28	52.8
2	13	24.5
3	12	22.6
Ukupno	53	100

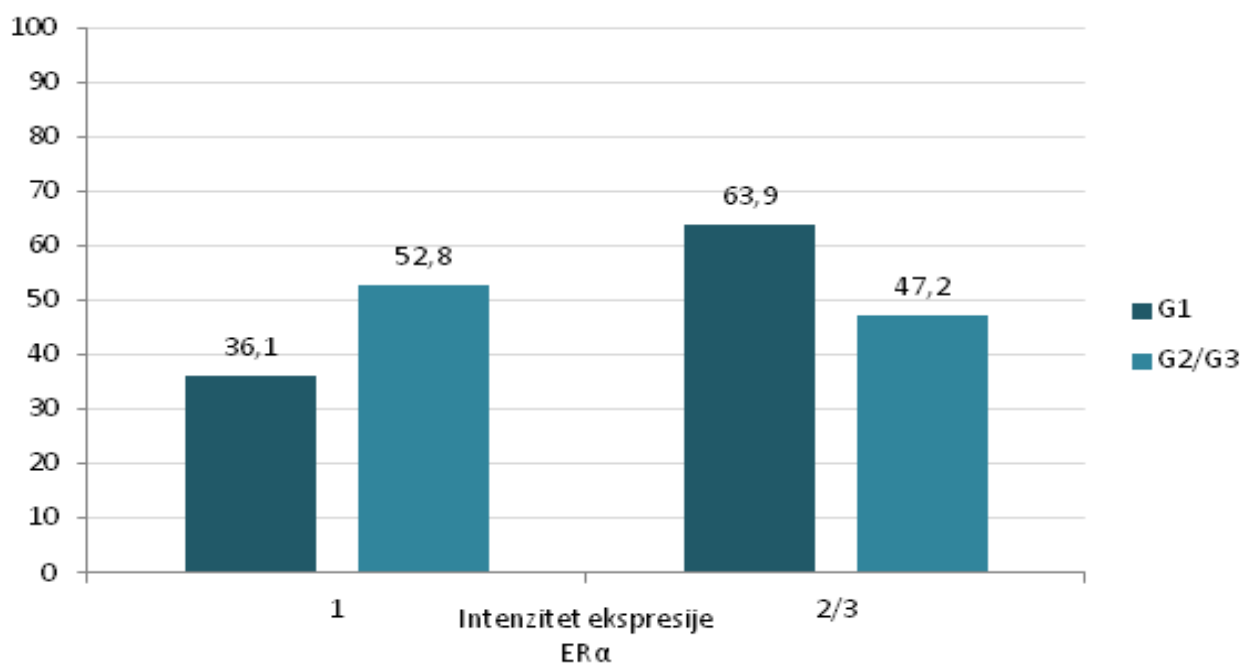
Estrogeni receptor alfa (ER α); FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)

Nije pronađena značajna povezanost ($p=0.120$) intenziteta ekspresije ER α sa histološkim gradusom tumora (Tabela 51) (Slika 26).

Tabela 51. Korelacija ekspresije ER α sa histološkim gradusom karcinoma endometrija

Intenzitet ekspresije ER α	Vrednosti	G1	G2/G3	Značajnost (p)
	1	36.1% (n=13)	52.8% (n=28)	
2/3	63.9% (n=23)	47.2% (n=25)		

Estrogeni receptor alfa (ER α) ; G1,G2, i G3 (gradus 1,2, i 3)



Slika 26. Korelacija ekspresije ER α sa histološkim gradusom karcinoma endometrija

Estrogeni receptor alfa (ER α) ; G1,G2, i G3 (gradus 1,2, i 3)

U grupi EEC-a FIGO gradusa 1 najučestaliji su bili (44.4%) slučajevi sa između 11 do 33% ER α pozitivnih epitelnih ćelija. Slični procentualna zastupljenost ekspresije ER α je uočena (52.8%) u grupi EEC-a sa višim histološkim gradusom (Tabela 52-53).

Tabela 52. Procentualna zastupljenost ekspresije ER α u karcinomu endometrijuma FIGO gradusa 1

Procentualna zastupljenost ekspresije ER α	Učestalost	Procent
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	16	44.4
4	9	25
5	11	30.6
Ukupno	36	100

Estrogeni receptor alfa (ER α); FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)

Tabela 53. Procentualna zastupljenost ekspresije ER α u karcinomu endometrijuma FIGO gradusa 2 i 3

Procentualna zastupljenost ekspresije ER α	Učestalost	Procent
0	0	0
1	1	1.9
2	3	5.7
3	28	52.8
4	12	22.6
5	9	17
Ukupno	53	100

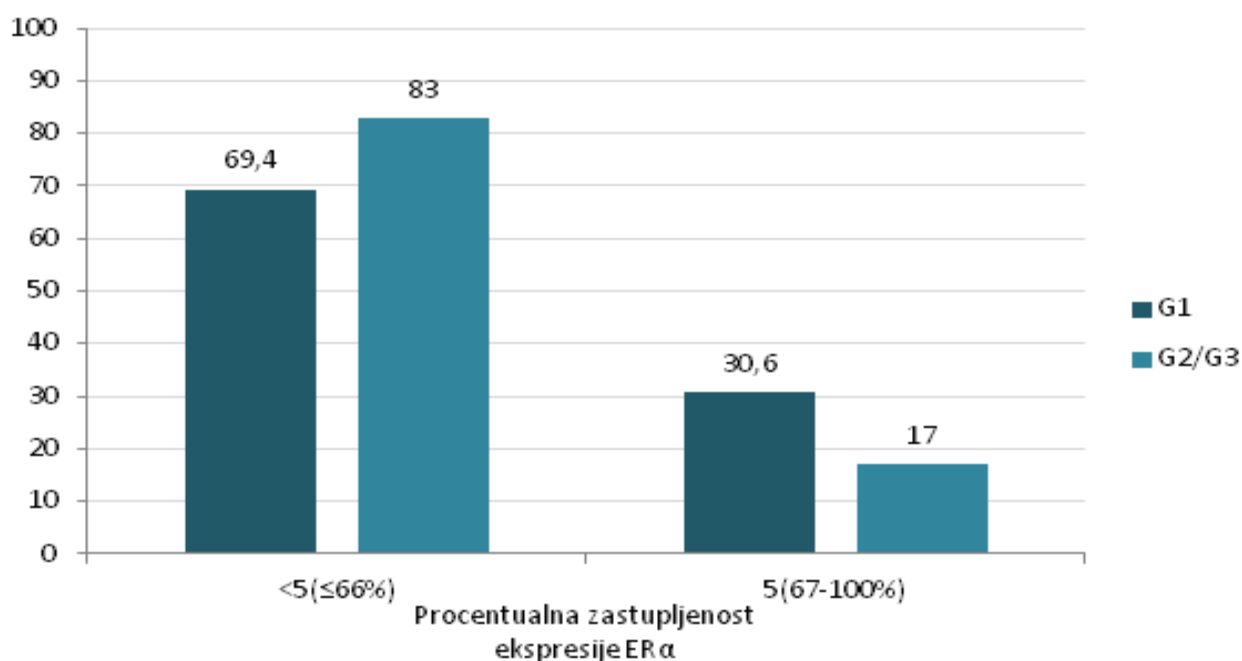
Estrogeni receptor alfa (ER α); FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)

Nije pronađena značajna povezanost ($p=0.132$) procentualne zastupljenosti ekspresije ER α sa histološkim gradusom tumora (Tabela 54) (Slika 27).

Tabela 54. Korelacija procentualne zastupljenost ekspresije ER α u karcinomu endometriju sa gradusom tumora

Procentualna zastupljenost ekspresije ER α	Vrednosti	G1	G2/G3	Značajnost (p)
	<5(\leq 66%)	69.4% (n=25)	83% (n=44)	
5(67-100%)	30.6% (n=11)	17% (n=9)		0.132

Estrogeni receptor alfa (ER α); G1,G2, i G3 (gradus 1,2, i 3)



Slika 27. Korelacija procentualne zastupljenost ekspresije ER α u karcinomu endometriju sa gradusom tumora

Estrogeni receptor alfa (ER α); G1,G2, i G3 (gradus 1,2, i 3)

Nivo ekspresije ER α određen Allred-ovim skorom nije pokazao značajnu povezanost ($p>0.05$) sa histološkim gradusom karcinoma endometriju. Medijana vrednosti Allred-ovog skora za EEC FIGO gradusa 1 je bila 6, dok je u grupi EEC viših gradusa medijana vrednosti Allred-ovog skora iznosila 5 (Tabela 55).

Tabela 55. Deskriptivne statističke mere Allred-ovog skora u endometrioidnim karcinomima endometrija u odnosu na histološki gradus

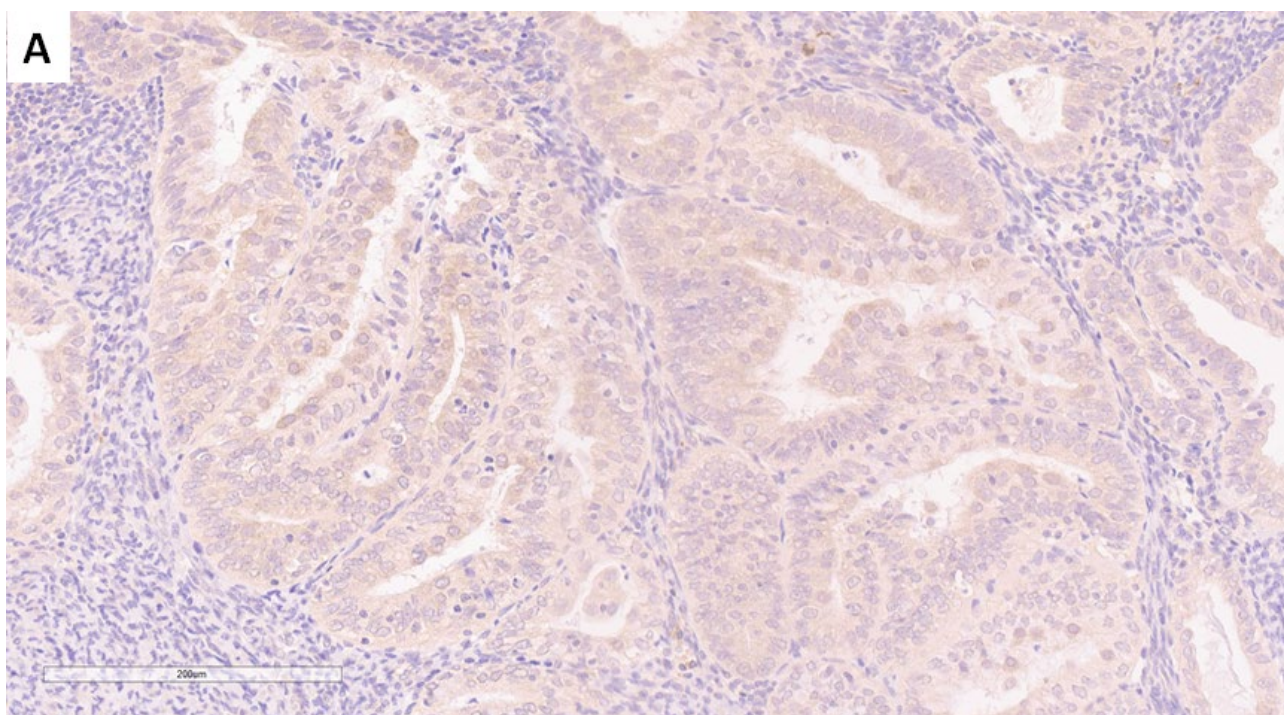
Allred-ov skor	G1			G2/G3		
	Medijana	Minimum	Maksimum	Medijana	Minimum	Maksimum
	P1	8	6	8	5	2
P2	8	6	8	5	2	8

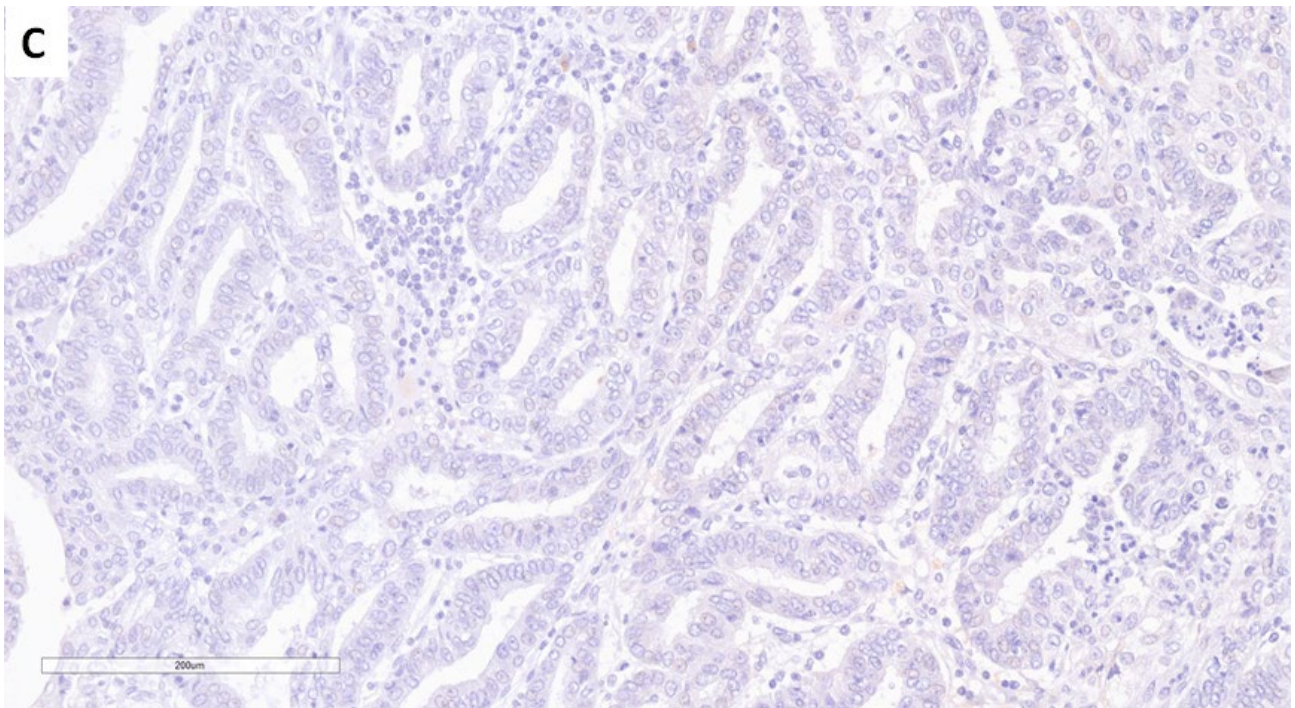
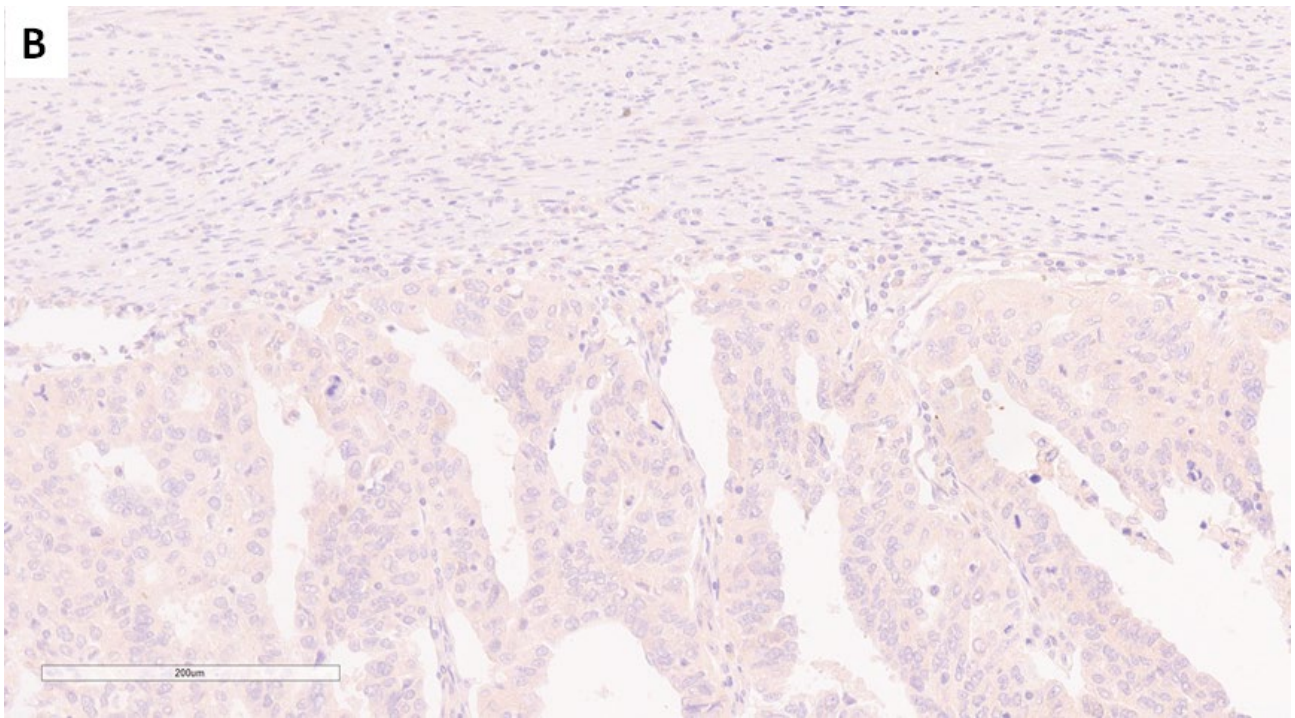
G1, G2, i G3 (gradus 1, 2, i 3); P1 i P2 (patolog 1 i 2)

4.5. Ekspresija VEGF-A u endometrioidnom karcinomu endometrija i benignoj hiperplaziji endometrija

4.5.1. Razlika ekspresije VEGF-A u endometrioidnom karcinomu endometrija i benignoj hiperplaziji endometrija

U uzorcima EEC uočen je nizak i umeren intenzitet ekspresije VEGF-A utvrđen u 42,7% (N=38) EEC (Slika 28) (Tabela 56).





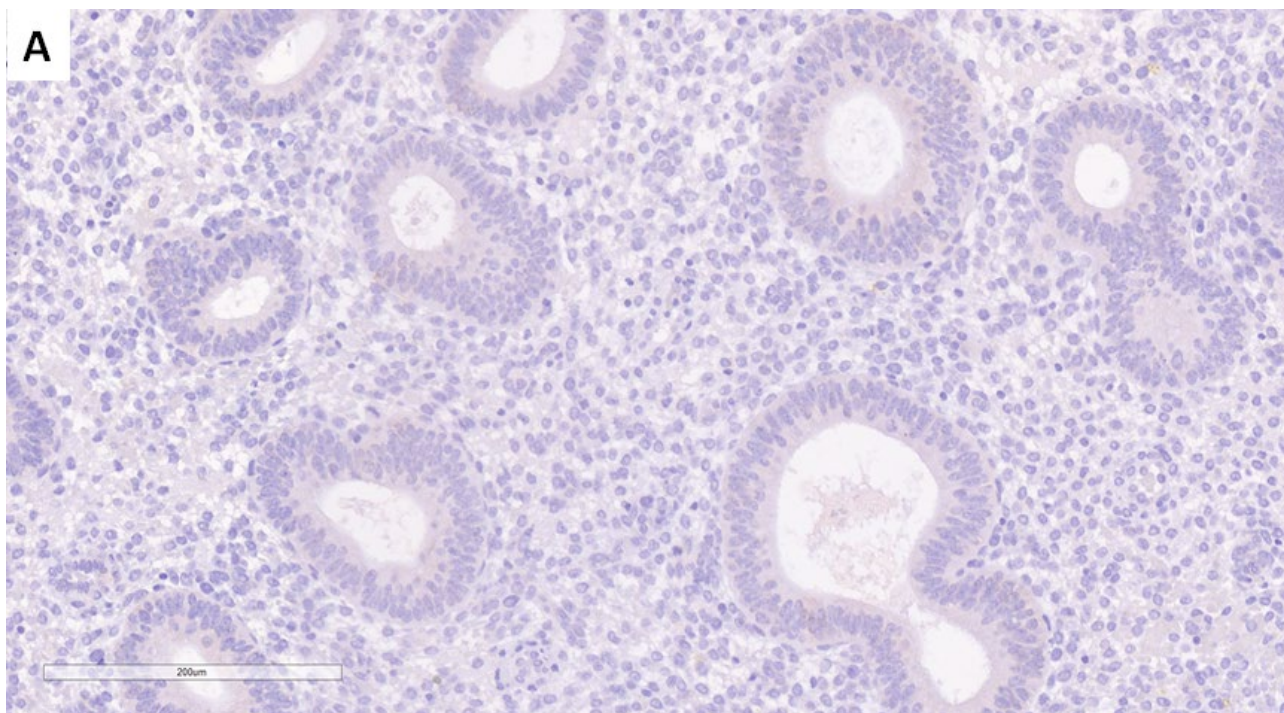
Slika 28. Ekspresija VEGF-A A) umerenog intenziteta, B) niskog intenziteta i C) odsustvo ekspresije VEGF-A u tkivu endometrioidnog karcinoma endometrijuma, VEGF-A x200

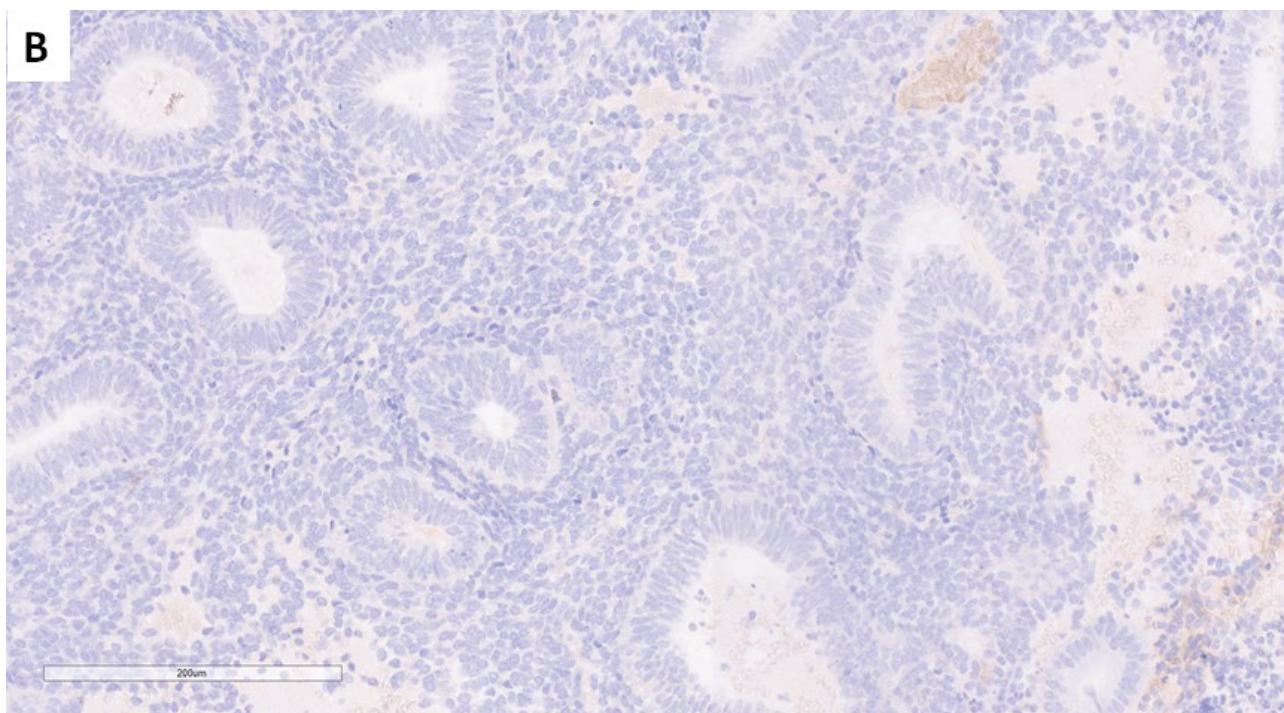
Tabela 56. Intenzitet ekspresije VEGF-A u endometrioidnom karcinomu endometrijuma

Intenzitet ekspresije VEGF-A	Učestalost	Procenat
0	51	57.3
1	36	40.4
2	2	2.2
3	0	0
Ukupno	89	100

VEGF-A (eng. *vascular endothelial growth factor-A*)

Imunohistohemijaska ekspresija VEGF-A nije pokazana u 95% (N=38) slučajeva BEH, dok su slučajevi sa prisutvom reakcije pokazali slab intenzitet ekspresije (Slika 29)(Tabela 57).





Slika 29. Ekspresija VEGF-A, A) niskog intenziteta i B) odsustvo ekspresije VEGF-A u tkivu benigne hiperplazije endometrijuma. VEGF-A x200

Tabela 57. Intenzitet ekspresije VEGF-A u benignoj hiperplaziji endometrijuma

Intenzitet ekspresije VEGF-A	Učestalost	Procenat
0	38	95
1	2	5
2	0	0
3	0	0
Ukupno	40	100

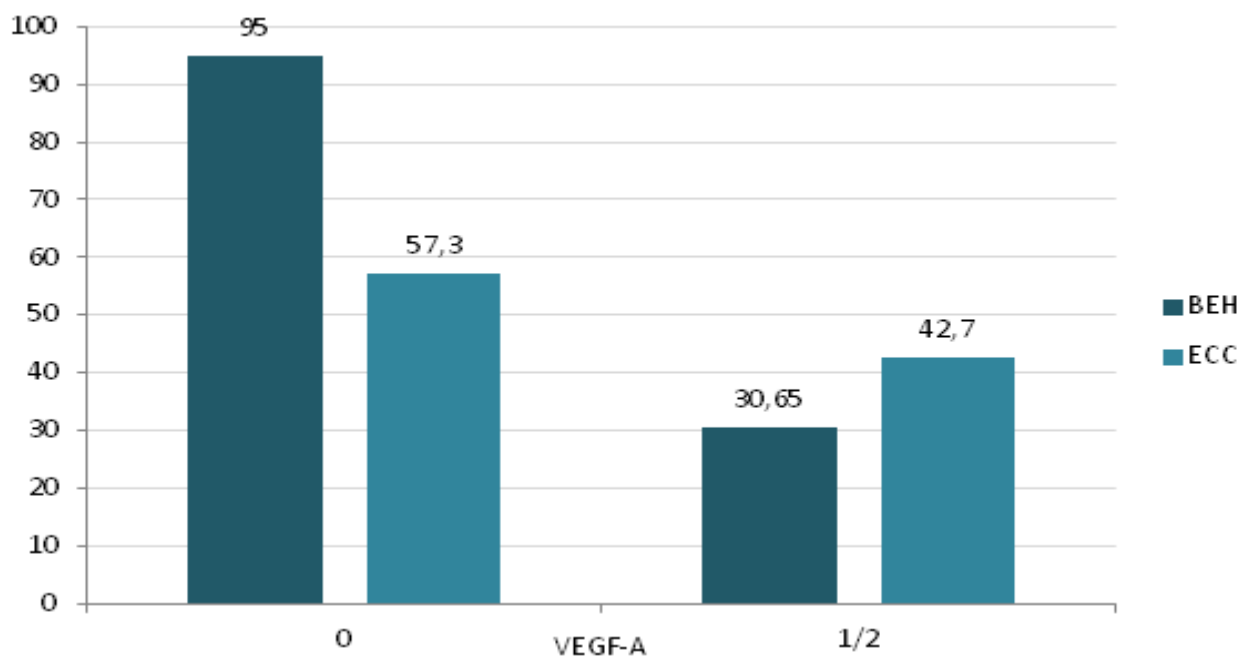
VEGF-A(eng. *vascular endothelial growth factor-A*)

Postojala je značajna razlika u intenzitetu ekspresije VEGF-A između EEC i BEH ($p < 0,001$), koja jasno ukazuje na povećan intenzitet ekspresije unutar tkiva sa malignim promenama endometrijuma (Tabela 58) (Slika 30).

Tabela 58. Razlika nivoa ekspresije VEGF-A u endometrioidnim karcinomima i benignoj hiperplaziji endometrijuma

	BEH n=40	EEC n=89	Značajnost (p)
VEGF-A	95% (n=38)	57.3% (n=51)	<0.001
	5% (n=2)	42.7% (n=38)	

VEGF-A (eng. *vascular endothelial growth factor-A*); BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)



Slika 30. Razlika nivoa ekspresije VEGF-A u endometrioidnim karcinomima i benignoj hiperplaziji endometrijuma

BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)

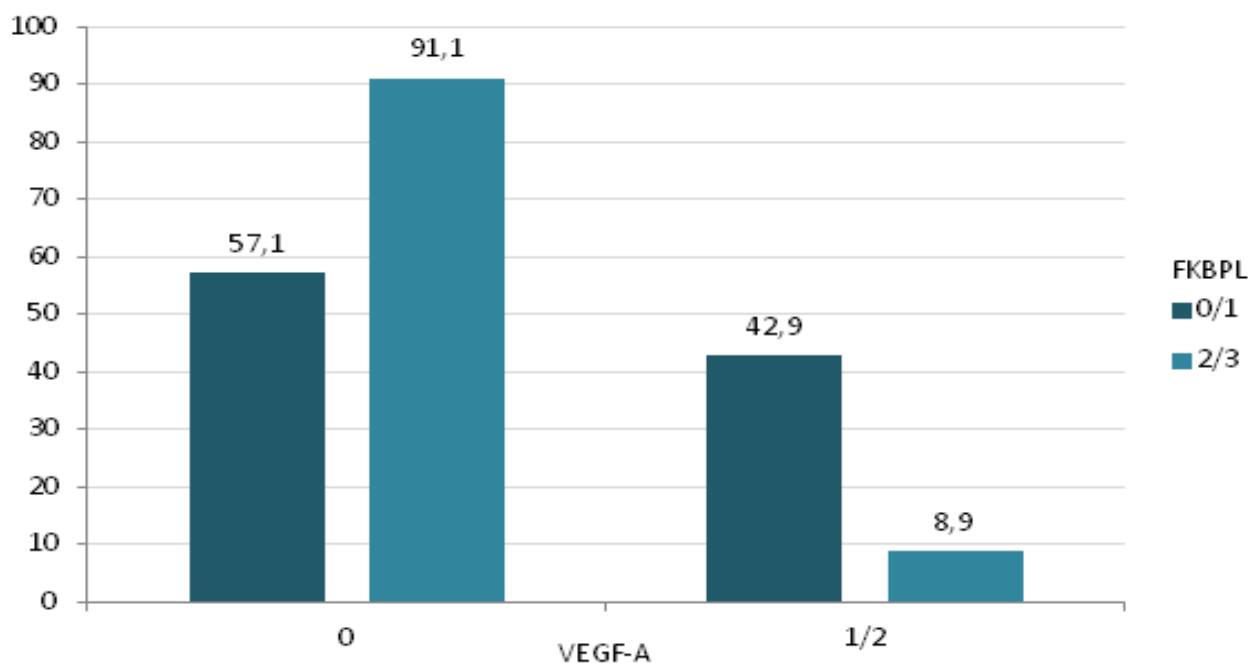
4.5.2. Korelacija ekspresije FKBPL i VEGF-A

Intenzitet ekspresije FKBPL, posmatran na kompletnom uzoraku BEH i EEC, je bio u umereno negativnoj korelaciji ($p < 0,05$) sa intenzitetom ekspresije VEGF-A (Tabela 59) (Slika 31).

Tabela 59. Korelacija intenziteta ekspresije VEGF-A sa intenzitetom ekspresije FKBPL u celokupnom uzorku

	FKBPL			Značajnost
	Vrednosti	0/1	2/3	
VEGF-A	0	57.1 (n=48)	91.1 (n=41)	p<0,05
	1/2	42.9 (n=36)	8.9 (n=4)	

VEGF-A(eng. *vascular endothelial growth factor-A*); FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*)



Slika 31. Korelacija intenziteta ekspresije VEGF-A sa intenzitetom ekspresije FKBPL u celokupnom uzorku

VEGF-A (eng. *vascular endothelial growth factor-A*); FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*)

4.5.3. Korelacija ekspresije VEGF-A sa tumorskim gradusom

U grupi EEC-a FIGO gradusa 1 najučestaliji su bili (94.4%) slučajevi sa slabim intenzitetom ili bez ekspresije VEGF-A, dok je celokupan uzorak EEC-a sa višim histološkim gradusom bio negativan ili slabog intenziteta ekspresije VEGF-A (Tabela 60-61).

Tabela 60. Intenzitet ekspresije VEGF-A u karcinomu endometrijujuma FIGO gradusa 1

Intenzitet ekspresije VEGF-A	Učestalost	Procenat
0	14	38.9
1	20	55.6
2	2	5.6
3	0	0
Ukupno	36	100

VEGF-A (eng. *vascular endothelial growth factor-A*); FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)

Tabela 61. Intenzitet ekspresije VEGF-A u karcinomu endometrijujuma FIGO gradusa 2 i 3

Intenzitet ekspresije VEGF-A	Učestalost	Procenat
0	34	64.2
1	19	35.8
2	0	0
3	0	0
Ukupno	53	100

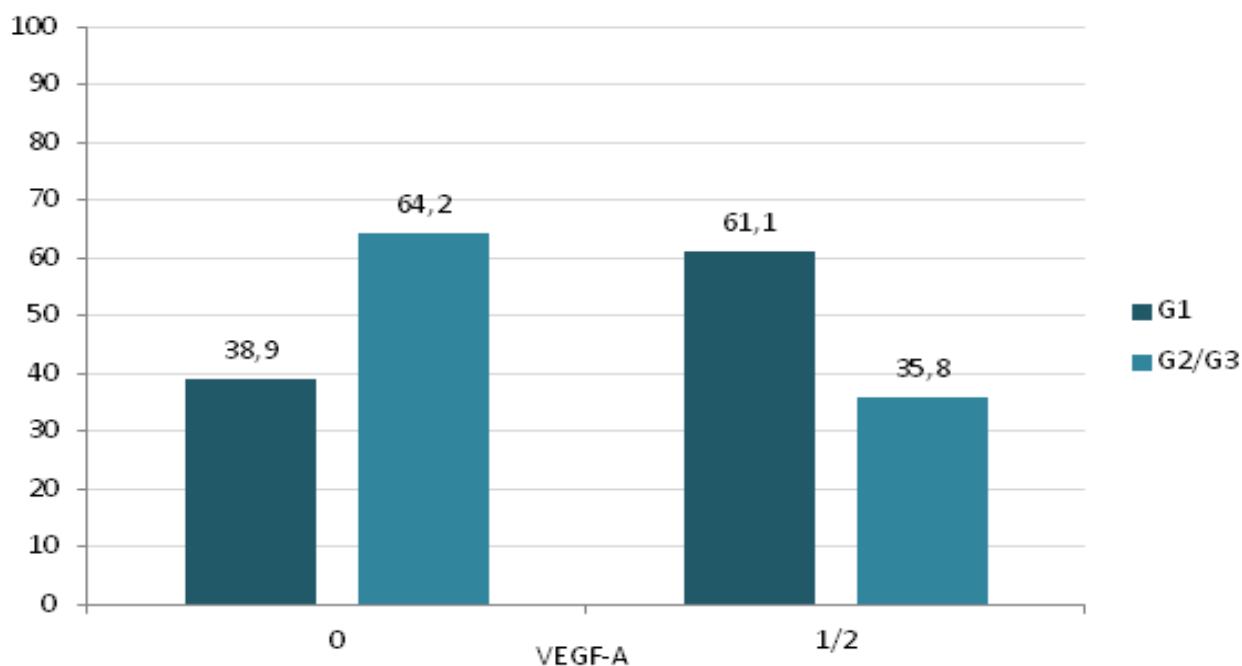
VEGF-A (eng. *vascular endothelial growth factor-A*); FIGO (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)

Pronađena je značajna povezanost ($p=0.019$) intenziteta ekspresije VEGF-A sa histološkim gradusom tumora (Tabela 62) (Slika 32).

Tabela 62. Korelacija ekspresije VEGF-A sa histološkim gradusom karcinoma endometrijujuma

		G1	G2/G3	Značajnost (p)
VEGF-A	0	38.9% (n=14)	64.2% (n=34)	0.019
	1/2	61.1% (n=22)	35.8% (n=19)	

VEGF-A (eng. *vascular endothelial growth factor-A*); G1, G2, i G3 (gradus 1, 2, i 3)



Slika 32. Korelacija ekspresije VEGF-A sa histološkim gradusom karcinoma endometriijuma
VEGF-A (eng. *vascular endothelial growth factor-A*); G1,G2, i G3 (gradus 1,2, i 3)

4.5.4. Validacija metode za morfometrijsku analizu ekspresije VEGF-A

Morfometrijski metod kvantifikacije intenziteta imunohistohemijske reakcije antitela kojim se intenzitet pozitivnosti predstavlja kroz procenat površine regije od interesa se pokazao neadekvatim usled specifičnosti imunohistohemijske reakcije antitela VEGF-A. Obzirom da se VEGF-A pozitivna imunohistohemijska reakcija javlja u svim epitelnim ćelijama endometriijuma jednako, citoplazmatskom i membranskom pozitivnošću, u toku procesa validacije, ovom metodom su dobijene vrednosti 100% pokrivenosti površine žlezdanog epitela pozitivnim signalom hromogena, kao analizirane regije od interesa, na svim preparatima gde je pozitivna imunohistohemijska reakcija na VEGF-A bila prisutna, bez razlike između slučajeva koji su prethodnom analizom svetlosnim mikroskopom utvrđeni slab, umeren i jak intenzitet imunohistohemijske reakcije. Naš zaključak je bio da se kvantifikacija imunohistohemijske reakcije VEGF-A ne može adekvatno izvršiti ovom metodom, zato što promena intenziteta pozitivnosti VEGF-A nepokazuje varijacije u distribuciji, već su rezlike u intenzitetu vidljive kao promene u svetlosnom spektru hromogena.

4.6. Vaskularna gustina u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma

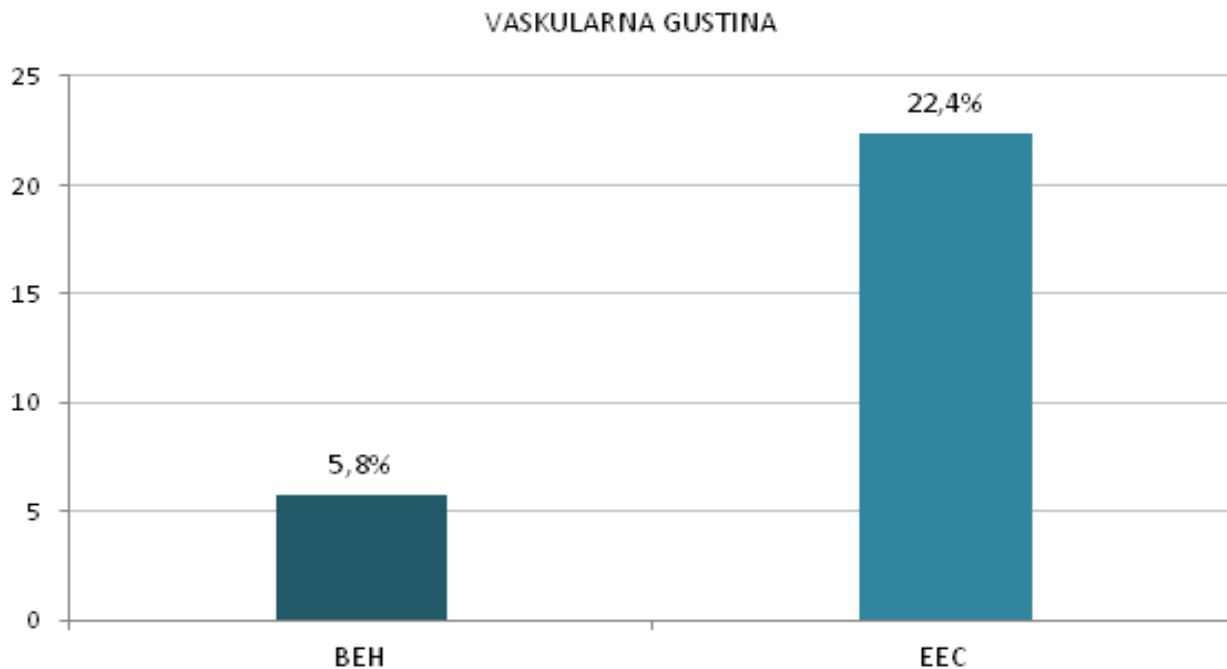
4.6.1. Razlika vaskularne gustine u endometrioidnom karcinomu endometrijuma i benignoj hiperplaziji endometrijuma

Analizom vaskularne gustine (eng. *microvessel density*, MVD), poredeći grupe od po 10 slučajeva BEH i EEC, obojenih antitelom CD34, uočena je značajna razlika ($p < 0.001$) u MVD između EEC i BEH. Uočeno je povećanje procenta površine tkivne strome pokrivena endotelnim ćelijama krvnih sudova obeleženih antitelom CD34 u slučajevima EEC u odnosu na BEH (Tabela 63) (Slika 33-35).

Tabela 63. Razlika vaskularne gustine između EEC i BEH

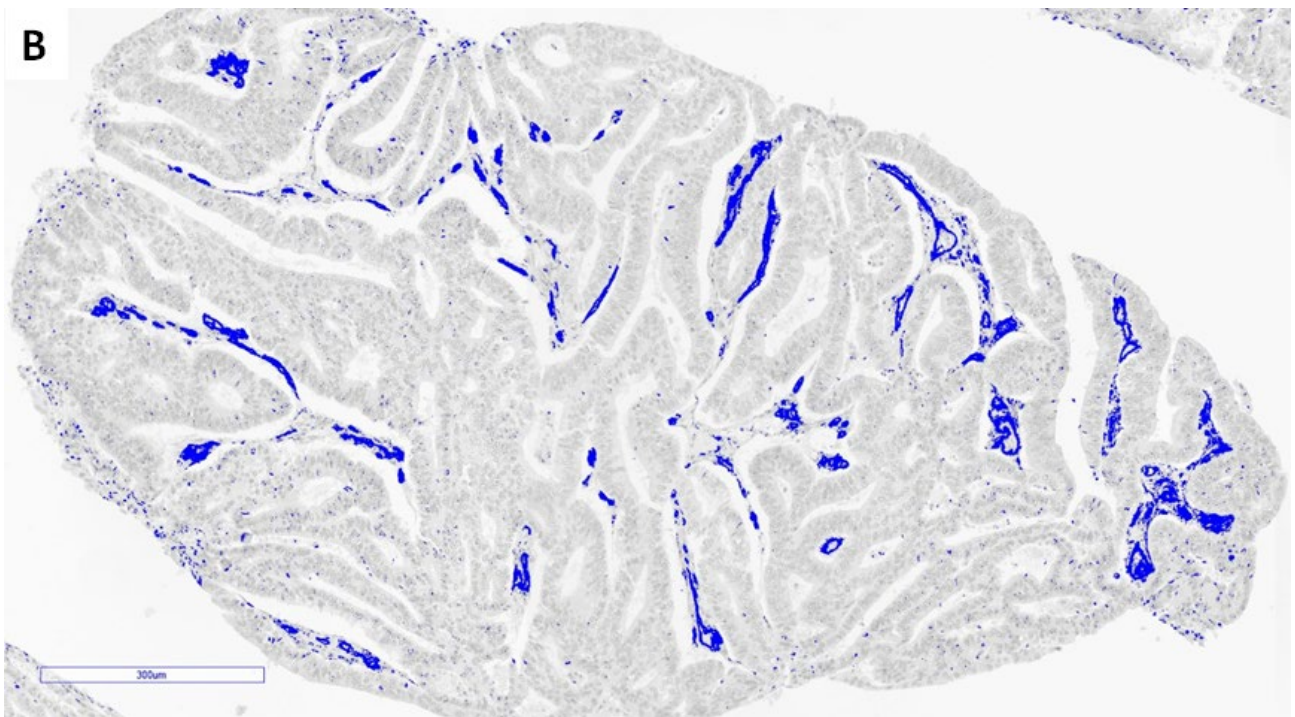
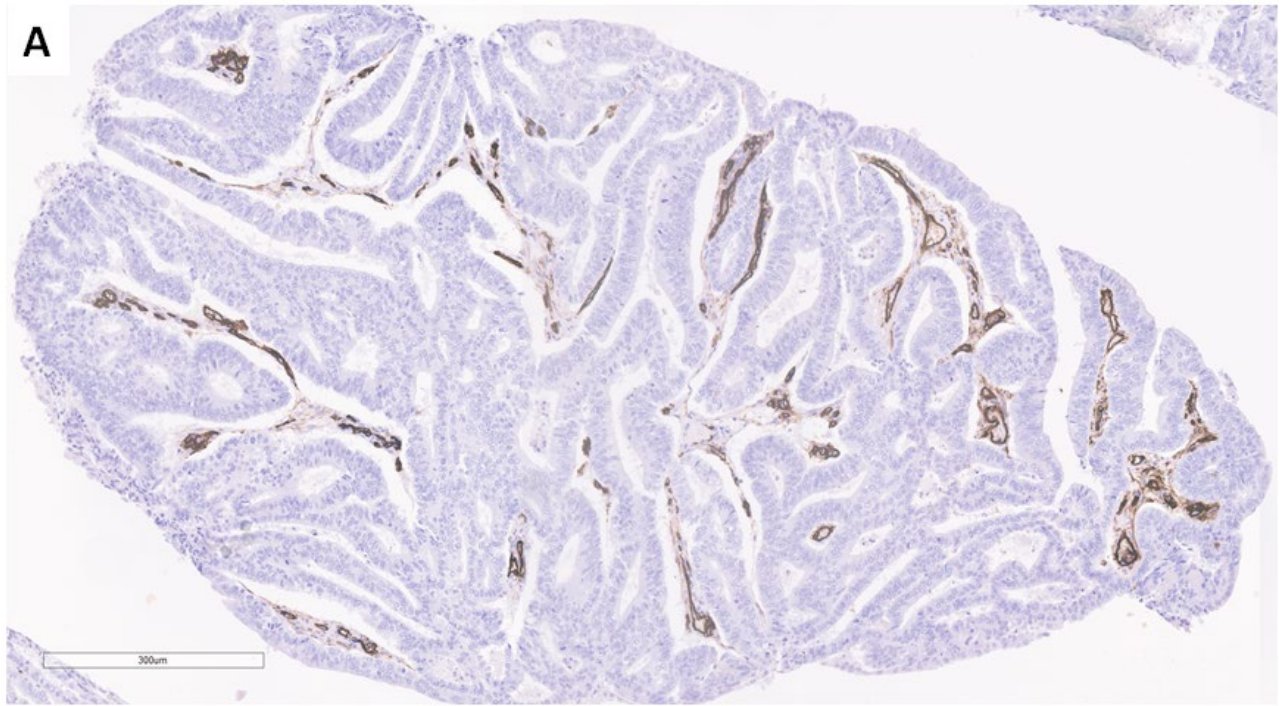
	BEH (n=10)	EEC (n=10)	Značajnost (p)
MVD	5.8% SD=1.099	22.4% SD=7.997	<0.001

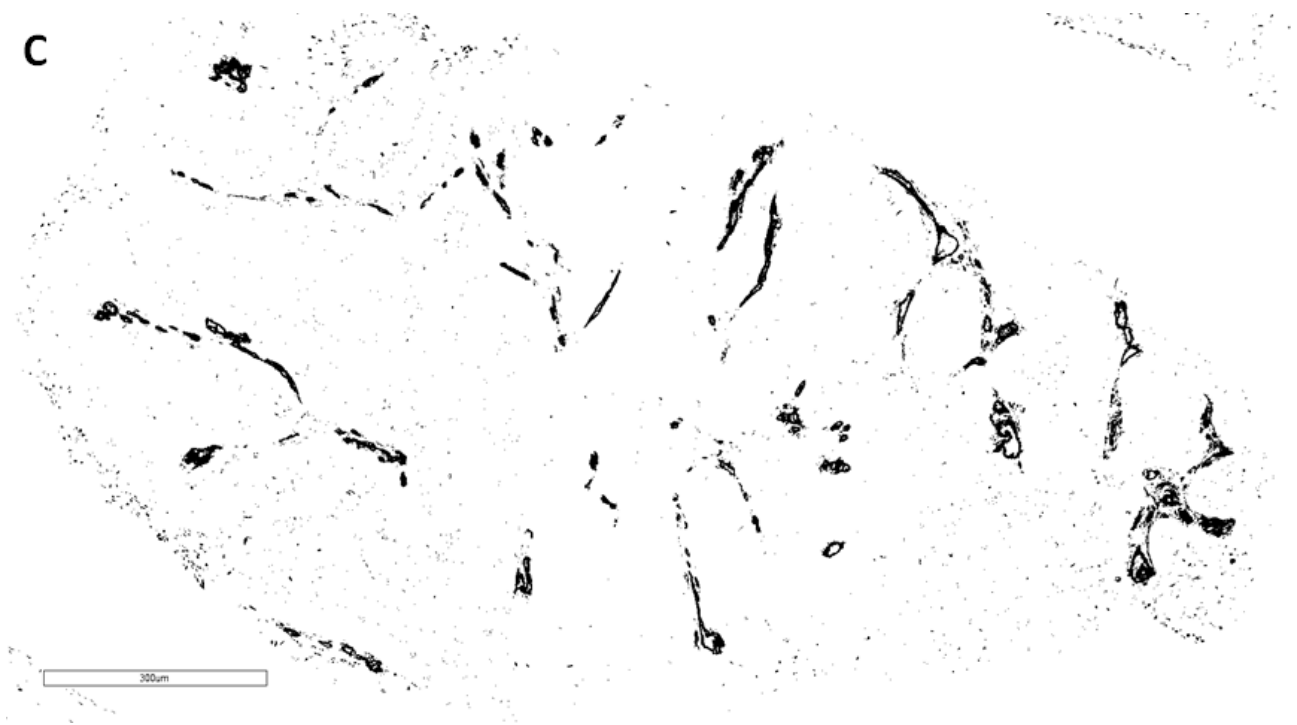
Vaskularna gustina (eng. *microvessel density*, MVD); BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)



Slika 33. Razlika vaskularne gustine između EEC i BEH

BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)

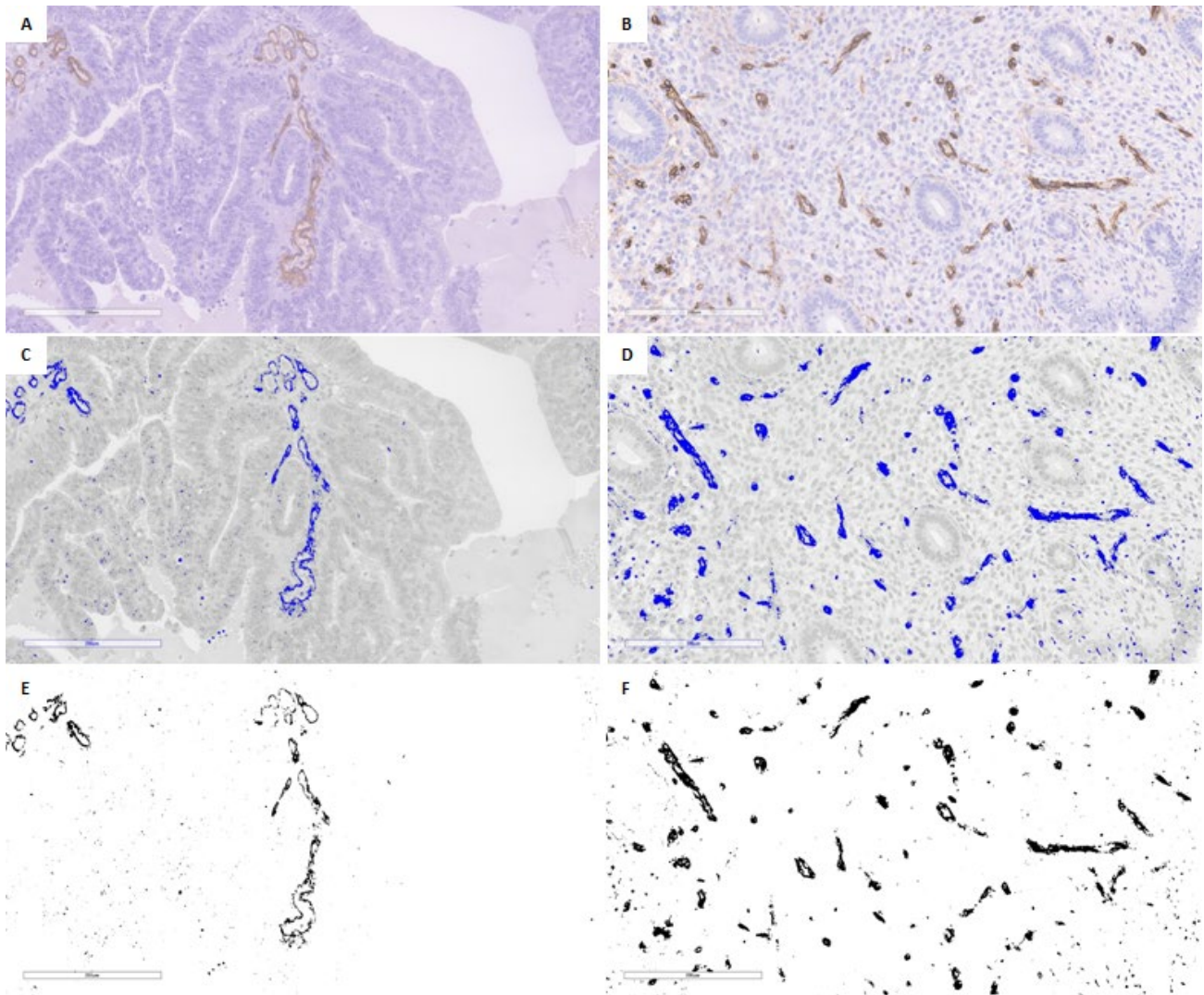




Slika 34. Imunohistohemijsko bojenje antitelom CD34 u tkivu endometrioidnog karcinoma A), izdvojen signal hromogena antitela CD34 obeležen plavom bojom u odnosu na tkivne strukture B), slika prevedena u 8bit-nu formu sa izdvojenom površinom krvnih sudova obeleženom crnom bojom C)

4.6.2. Korelacija intenziteta ekspresije FKBPL i vaskularne gustine

Uočena je značajna povezanost ($p < 0.001$) intenziteta ekspresije FKBPL sa nivoom vaskularne gustine analizirano u celokupnom uzorku ($n=20$) preparata EEC i BEH obojenih antitelom CD34. Rezultati su pokazali značajnu negativnu korelaciju između intenziteta ekspresije FKBPL i nivoa vaskularne gustine. Značajnost je uočena u odnosu na oba seta vrednosti intenziteta ekspresije FKBPL izmerenim nezavisnom analizom od strane dva patologa za navednu grupu slučajeva (Tabela 64-65).



Slika 35. Imunohistohemijsko bojenje antitelom CD34 u tkivu EEC A) i BEH B), izdvojen signal hromogena antitela CD34 obeležen plavom bojom u odnosu na tkivne strukture EEC C) i BEH D), slika prevedena u 8bit-nu formu sa izdvojenom površinom krvnih sudova obeleženom crnom bojom u EEC E) i BEH F)

BEH (eng. *benign endometrial hyperplasia*), EEC (eng. *endometrial endometrioid carcinoma*)

Tabela 64. Korelacija vaskularne gustine sa vrednostima intenziteta ekspresije FKBPL izmerenih od strane patologa 1 u tkivima endometrioidnog karcinoma i benigne hiperplazije endometrijuma.

P1	MVD	Značajnost (p)
FKBPL	Rho=0.793; N=20	<0.001

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); Vaskularna gustina (eng. *microvessel density*, MVD); Koeficijent korelacije (Rho); P1 (patolog 1)

Tabela 65. Korelacija vaskularne gustine sa vrednostima intenziteta ekspresije FKBPL izmerenih od strane patologa 2 u tkivima endometrioidnog karcinoma i benigne hiperplazije endometrijuma.

P2	MVD	Značajnost (p)
FKBPL	Rho=0.781; N=20	<0.001

FKBPL (eng. *FK506-binding protein-like*); Vaskularna gustina (eng. *microvessel density*, MVD); Koeficijent korelacije (Rho); P2 (patolog 2)

55. DISKUSIJA

Imajući u vidu da su ključni dokazi o antitumorskom i antiangiogenom dejstvu FKBPL-a, kao i njegova interakcija sa ER α , najvećim delom utvrđeni studijama na karcinomu dojke i jajnika, kao tumorima tkiva biloški srodnih endometriju, neobičan je podatak o nedostatak ispitivosti FKBPL-a u tkivu karcinoma endometrija. Glavni cilj ovog istraživanja je bio da se ispita da li postoji razlika u ekspresiji FKBPL između tkiva endometrioidnog karcinoma i hiperplazije endometrija;

Na osnovu analize imunohistohemijskog bojenja, naša studija je pokazala da je u 97,5% uzoraka benigne hiperplazije uočen jak ili umeren intenzitet ekspresije FKBPL, dok je nasuprot ovom rezultatu, slab intenzitet, ili gubitak ekspresije, uočen u 93.3% endometrioidnih karcinoma. Analiza je pokazala statistički značajnu razliku ($p < 0.001$) snižene ekspresije antiangiogenog FKBPL proteina u endometrioidnom karcinomu u odnosu na nivo ekspresije u uzorcima hiperplazije endometrija.

Uloga FKBPL u biološkom ponašanju tumora je velikim delom definisana njegovim dejstvom na tumorski rast kroz inhibiciju angiogeneze i posleđično usporavanje tumorskog rasta u prisustvu FKBPL ili pojavu nekontrolisane prekomerne angiogeneze i ubrzanog tumorskog rasta u odsustvu ekspresije FKBPL (Annett, 2020). Naši rezultati koji pokazuju različite nivoe ekspresije FKBPL između endometrioidnog karcinoma i hiperplazije endometrija su u skladu sa studijama koje analiziraju ulogu ekspresije FKBPL prateći njegov uticaj u bazičnim osbinama biološkog ponašanja tumorskih ćelija. Ispitivanje nivoa FKBPL u medijumu kultura ćelija zdravih pneumocita i endotelnih ćelija, u odnosu na medijum u kulturama ćelija karcinoma dojke, od strane Valentine i saradnika, je pokazalo da je FKBPL je detektovan u medijumu kultura zdravih ćelija, a da nije mogao biti detektovan u medijumu kulture ćelija karcinoma dojke. U studiji je zaključeno da je FKBPL endogeno sekretovani protein čija nishodna regulacija u neoplastičnim ćelijama omogućava nekontrolisani potencijal za rast tumora. Istom studijom je, daljim ispitivanjem, pokazano da je primena prečišćenog rekombinantnog FKBPL, koji je bio ubrizgavan u ksenograftove tumorskog tkiva, uočen izuzetan antiangiogeni, ali i antimigratorni efekat, usporavajući grananje i rast krvnih sudova. Ovo je bilo praćeno usporenim tumorskim rastom, kao i javljanjem tumorske nekroze. Sličan efekat je pokazan inhibicijom vaskularnog grananja, nakon dodavanja peptidnog derivata FKBPL-a, AD-01 u eseju aortnog prstena (eng. *aortic ring assay*) (Valentine, 2011).

U našoj studiji je analizom vaskularne gustine uočena značajna razlika ($p < 0.001$) između tkiva endometrioidnog karcinoma i hiperplazije endometrija. Prema našim rezultatima prosečno 5.8 % površine strome je bilo pokriveno endotelnim ćelijama u slučajevima hiperplazije endometrija, nasuprot tumorskoj stromi u kojoj je pokrivenost prosečno iznosila 22.4%. Daljom analizom pokazana je značajna povezanost ($p < 0.001$) intenziteta ekspresije FKBPL sa nivoom vaskularne gustine analizirane u celokupnom uzorku preparata karcinoma i hiperplazija obojenih antitelom CD34. Rezultati su pokazali značajnu negativnu korelaciju između intenziteta ekspresije FKBPL i nivoa vaskularne gustine. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Yakkundi i saradnika koja pokazuje uticaj FKBPL na fiziološku i tumorsku angiogenezu, na modelima FKBPL-knockdown homozigotnih i heterozigotnih miševa. U navedenoj studiji je inicijalno potvrđena ključna uloga FKBPL u fiziološkoj angiogenezi pokazana apsolutnim letalitetom embriona homozigotnih FKBPL-knockdown miševa. Heterozigotna FKBPL-knockdown grupa miševa je u eksperimentu implantacije ksenograftova tumorskih ćelija karcinoma dojke pokazala brži tumorski rast praćen povišenim vaskularnim grananjem u odnosu na ksenograftove implantirane na zdravim miševima. Deo ove studije izveštava o niskom nivou sekrecije FKBPL u ćelijskoj kulturi karcinoma dojke u poređenju sa humanim mikrovaskularnim endotelnim ćelijama (HMEC-1), i smanjenjem sekrecije FKBPL od strane HMEC-1 pri kultivaciji u hipoksičnim uslovima (Yakkundi, 2015). U studiji orijentisanom ka formulisanju peptidom posredovanog sistema dostavljanja malih interferirajućih molekula RNK, pokazan je efekat odsustva FKBPL-a u vidu dužeg perioda preživljavanja

tumorskih ćelija, većeg stepena proliferacije i značajno povećane vaskularne gustine u kulturama ćelija karcinoma dojke tretiranih malom interferirajućom RNK koja je dovela do knockdown efekta FKBPL-a (Bennett, 2015).

Daljom analizom faktora angiogeneze ispitali smo povezanost intenziteta ekspresije FKBPL i VEGF-A u tkivima endometrioidnog karcinoma i hiperplazije endometrijuma. Pokazano je da je u 91.1% slučajeva koji su imali umeren ili jak intenzitet ekspresije FKBPL pronađeno odsustvo ekspresije VEGF-A. Intenzitet ekspresije FKBPL je bio u negativnoj korelaciji ($p < 0.05$) sa intenzitetom ekspresije VEGF-A. Prethodne studije su pokazale da VEGF ne utiče na ekspresiju FKBPL, što je eksperimentalno demonstrirano *ex vivo* korišćenjem eseja aortnog prstena, gde je nakon tretmana VEGF-om, povećana angiogeneza uočena u grupi heterozigotnih FKBPL-knockdown miševa, kao i u grupi zdravih kontrola, što sugerise da FKBPL i VEGF utiču na angiogenezu putem različitih mehanizama (Yakkundi, 2015). U svetlu ovih izveštaja, negativna korelacija, koju smo našim rezultatima pokazali između FKBPL i VEGF-A, može ukazivati na indirektnu interakciju ili na dve nezavisne promene koje se međusobno dopunjuju kao deo pro-angiogenog prekidača (eng. *angiogenic switch*) u karcinomu endometrijuma. Takođe, imajući u vidu poznate podatke o pojedinačnoj povezanosti FKBPL i VEGF-A sa estrogenom i ER α (Berger, 2021; McKeen, 2010), možemo sugerisati alternativnu pretpostavku o potencijalnoj unakrsnoj vezi u regulaciji ravnoteže između ova dva proteina sa kontrastnim angiogenim efektima.

Dosadašnje studije su pokazale povezanost estrogena i ER α sa FKBPL. Dokazano je da je sekrecija FKBPL ushodno regulisana dejstvom estradiola. Istovremeno pokazano je da u FKBPL-knockdown ćelijama dolazi do hiperfosforilacije ER α , što je praćeno rezistencijom ćelija karcinoma dojke na endokrinu terapiju. S druge strane ustanovljeno je da povećana ekspresija FKBPL praćena povećanom senzitivnošću na terapiju tamoksifenom i nishodnom regulacijom ER α u ćelijama karcinoma dojke (McKeen, 2010). Naša studija je pokazala drugačije rezultate. Analizom povezanosti intenziteta ekspresije FKBPL i ER α u tkivima endometrioidnog karcinoma i hiperplazije endometrijuma uočeno je da je da je 97.8% slučajeva sa umerenim ili visokim intenzitetom FKBPL pokazalo umeren ili visok intenzitet ekspresije ER α , da je 77.4% slučajevima sa niskim intenzitetom ili gubitkom ekspresije FKBPL pokazalo pozitivnost ER α u manje od 67% epitelnih ćelija, kao i da je 37 od 45 slučajeva sa umerenim ili visokim intenzitetom ekspresije FKBPL imalo visoke vrednosti Allred-ovog skora. U odnosu na sva tri parametra koja se odnose na nivo ekspresije ER α pronađena je značajna pozitivna korelacija ($p < 0.05$) sa intenzitetom ekspresije FKBPL. Allred-ov skor je pokazao najjaču korelaciju. Ovi nalazi su zanimljivi s obzirom da su prethodni izveštaji pokazali da veća ekspresija FKBPL smanjuje ekspresiju ER α u ćelijama karcinoma dojke, stoga je bilo očekivano da će ekspresija FKBPL i ER α biti u negativnoj korelaciji. Jedno od potencijalnih objašnjenja za ove razlike može biti da je ekspresija FKBPL stimulirana estrogenom, dok je u našoj studiji većina pacijentkinja bila u postmenopauzalnom dobu, koje karakterišu niži nivoi cirkulišućih estrogena. S druge strane možemo posmatrati ove interesantne rezultate, kroz specifičnosti efektorskih i regulatornih mehanizama ER α koja se odnosi na različito i tkivno specifično dejstvo endokrine terapije Tamoksifenom u tkivu dojke i u endometrijumu. Gottardis i saradnici su pokazali tkivnu specifičnost dejstva Tamoksifena serijom eksperimenata na miševima bez timusa kojima su implantirane ćelije karcinoma endometrijuma ili onih kojima su implantirane ćelije karcinoma dojke koji su zatim tretirani estradiolom, tamoksifenom i kombinacijom ova dva preparata. Pored inicijalnih rezultata koji su pokazali 1) stimulaciju rasta tumorskih ćelija estradiolom u obe grupe i 2) izostanak stimulacije tumorskog rasta tamoksifenom u ćelijama karcinoma dojke, a prisustvo stimulacije u ćelijama karcinoma endometrijuma, 3) nakon dodavanja i estradiola i tamoksifena, u ćelijama karcinoma endometrijuma je uočena dodatna indukcija rasta, dok je pokazano da tamoksifen inhibira rast stimulisan estradiolom u ćelijama karcinoma dojke. Ista studija je pokazala ushodnu regulaciju ER tamoksifenom u ćelijama karcinoma endometrijuma, a smanjenje broja ER nakon primene estradiola (Gottardis, 1988). Druga studija pozivajući se na premisu izvedenu iz prethodno navedenih rezultata, je pokušala da objasni

pojavu tkivne specifičnosti različitim strukturnim osobinama vezujućih mesta ER α između de novo nastalih karcinoma endometrija i onih koji su nastali nakon upotrebe Tamoksifena. Deo rezultata je pokazao sa postoji razlika nukleotidnih obrazaca (motiva) genskih sekvenci u vezujućim mestima na ER α , između grupe koja je koristila tamoksifen i grupe de novo nastalih karcinoma. Vezujuća mesta na ER α u grupi koja je koristila Tamoksifen je imala motive, estrogenog receptora 1, koji je vezujuće mesto androgenog, glukokortikoidnog i hormona štitaste žlezde, dok su vezujuća mesta u grupi de novo nastalih karcinoma imala motive SOX4 (sex-determining region Y box 4) i NANOG (Nanog homeobox) domena, koji se vezuje za pojavu karcinoma endometrija. Ista studija je pokazala razlike u regulaciji genske ekspresije usled različitih DNK vezujućih mesta za ER α ove dve grupe. Autori su istakli sličnost karakterističnih DNK vezujućih mesta za ER α između karcinoma endometrija nastalih nakon upotrebe Tamoksifena i karakterističnih vezujućih mesta za ER α u ćelijama karcinoma dojke (Droog, 2017). U studiji McClements i saradnika je ispitivan uticaj FKBPL i njegovih peptidnih derivata u matičnim tumorskim ćelijama karcinoma dojke rezistentnih na endokrinu terapiju Tamoksifenom. Rezultati su pokazali da eksperimentalno izazvana visoka ekspresija FKBPL i primena njegovih derivata AD01 i ALM-201 inhibiraju rast matičnih tumorskih ćelija karcinoma dojke rezistentnih na endokrinu terapiju (McClements, 2019)

Pored antitumorskih i antiangiogenih efekata FKBPL, poznata je i uloga FKBPL kao potencijalnog biomarkera (Nelson, 2015). U svetlu ovih podataka ispitali smo dijagnostičku tačnost intenziteta ekspresije FKBPL u endometrioidnom karcinomu i benignoj hiperplaziji endometrija.

Analizom dijagnostičke tačnosti intenziteta ekspresije FKBPL je pored visoke senzitivnosti i specifičnosti, pronađena je visoka pozitivna prediktivna vrednost (98,8%) i visoka negativna prediktivna vrednost (86,7%) niskih nivoa ekspresije FKBPL za dijagnozu maligne promene.

Ovi rezultati su u skladu sa nalazima studije Nelson L i saradnika koja navodi FKBPL kao biomarker dobre prognoze karcinoma dojke. Ova studija je pokazala da je niži nivo ekspresije FKBPL u karcinomima dojke praćen kraćim specifičnim vremenskim intervalom preživljavanja (eng. *breast cancer specific survival*), uključujući grupu bolesnika tretiranih Tamoksifenom. Prognostička značajnost nivoa ekspresije FKBPL u karcinomu dojke se pokazala kao nezavisna od drugih poznatih prognostičkih faktora, veličine tumora, gradusa, receptorskog statusa, zahvaćenosti limfnih nodusa, kao i u odnosu na Nottinghamski prognostički indeks (Nelson, 2015).

U svetlu razmatranja FKBPL kao biomarkera u diferencijalnoj dijagnozi benignih i malignih promena endometrija ispitali smo pouzdanost naših rezultata o intenzitetu ekspresije FKBPL u našoj studiji. Ispitivanje pouzdanosti rezultata dobijenih dvostruko slepom analizom je pokazalo visok stepen unutrašnje konzistentnosti za vrednosti intenziteta ekspresije FKBPL, VEGF-A, kao i parametara ekspresije ER α , intenziteta, procentualne zastupljenosti i Allred-ovog skora. Ovaj nalaz je od posebnog značaja u svetlu utvrđivanja optimalnog protokola za imunohistohemijsko bojenje endometrija FKBPL-om, kao i utvrđivanja adekvatnog metoda za analizu intenziteta ekspresije, zbog neophodne visoke reproducibilnosti, a obzirom da je ova studija, prema nama dostupnim izvorima, trenutno jedina naučna publikacija o imunohistohemijskoj ekspresiji FKBPL u endometriju, benignoj hiperplaziji i endometrioidnom karcinomu. Pregledom literature pronađena je samo jedna dostupna publikacija koje analizirala gensku ekspresiju FKBPL u karcinomu endometrija. Iguchi Y i saradnici navode da je, jedan iz grupe analiziranih proteina, čiju su gensku ekspresiju utvrdili unutar strome karcinoma endometrija, upravo FKBPL. U istoj studiji podaci o epitelnoj ekspresiji izostaju (Iguchi, 2014). Jedna od retkih publikacija koja navodi imunohistohemijski protokol bojenja za FKBPL, gde je korišćen sistem vizualizacije hromogenima za svetlosnu mikroskopiju je studija u kojoj Nelson i saradnici ispituju ekspresiju FKBPL na tkivnom mikronizu karcinoma dojke i istovremeno jedina publikacija koja je za ovu metodu primenila skor intenziteta imunohistohemijske reakcije analizirane svetlosnim mikroskopim gradirajući je semikvantitativno od 0 do 3 (Nelson, 2015). Odabir ovog pristupa je u skladu sa našim nalazima dobijenim tokom opisanog procesa validacije morfometrijske metode na osnovu kojih

smo zaključili da određivanje procenta površine pozitivne reakcije FKBPL u žlezdama nije adekvatan metod u odnosu na karakteristike imunohistohemijske reakcije i distribucije FKBPL u tkivu endometrijuma, kao i da je semikvantitativna analiza intenziteta ekspresije FKBPL pokazana kao metoda uzgoda. Pored navedenih studija jedini dostupni relevantni izvor o ekspresiji FKBPL u tkivu endometrijuma i karcinoma endometrijuma je pronađen u enciklopedijskoj bazi podataka atlasa humanih proteina, čiji su podaci o visokoj ekspresiji u žlezdanom tkivu zdravog endometrijuma (The Human Protein Atlas, Tissue expression of FKBPL, n.d.), a niskoj ekspresiji u epitelnim ćelijama karcinoma endometrijuma, bili u skladu sa rezultatima naše studije (The Human Protein Atlas, Expression of FKBPL in endometrial cancer, n.d.).

Uzevši u obzir izmerene visoke pozitivne i negativne prediktivne vrednosti za intenzitet ekspresije i pokazani visok stepen unutrašnje konzistentnosti pri interpretaciji, potencijalna uloga FKBPL kao biomarkera u endometrijumu može biti razmotrena za primenu u patohistološkom pregledu kiretmana kavuma uterusa, ako bi se rezultati slični rezultatima naše studije potvrdili istraživanjem na dijagnostički graničnim slučajevima, kao što je intraepitelna neoplazija endometrijuma.

Nakon analize dijagnostičke vrednosti FKPBL, razmatrali smo povezanost njegove ekspresije sa poznatim prognostičkim faktorima karcinoma endometrijuma. Izostatak korelacije nivoa ekspresije FKBPL, našeg istraživanja, sa histološkim gradusom, kliničkim stadijumom, dubinom invazije miometrijuma i prisustvom limfovaskularne invazije, može biti posledica ograničavajućih faktora studije, uključujući da je većina karcinoma bila niskog gradusa (gradus 1 i 2), kao i stadijuma I, što čini grupu tumora srodnog biološkog ponašanja. Ova ograničenja odgovaraju uobičajenim okolnostima u kliničkoj praksi, jer je većina slučajeva endometrioidnog karcinoma endometrijuma dijagnostikovano u rano zbog tipičnog simptoma abnormalnog uterinog krvarenja, što zahteva dalje ispitivanje pacijenata koje vodi pravovremenoj dijagnozi.

Pored odnosa sa ekspresijom FKBPL, u našoj studiji je analizirana razlika ekspresije ER α u endometrioidnom karcinomu i hiperplaziji endometrijuma. Svi analizirani parametri nivoa ekspresije ER α , intenzitet, procentualna zastupljenost ER α pozitivnih ćelija i Allred-ov skor su pokazali statistički značajnu ($p < 0.001$) razliku u ekspresiji ER α , koja ukazuje na viši nivo ekspresije ER α u hiperplastičnim u odnosu na tumorske promene. Ovo je u skladu sa opažanjima koja su prijavljena u grupi ER α negativni karcinoma endometrijuma kao povezanih sa lošijom prognozom. U istoj studiji je pozitivnost ER α okarakterisana kao pozitivan prognostički faktor u grupi karcinoma endometrijuma (Backes, 2016). Naši rezultati sugerišu da ovakva promena ekspresije nije isključivo prisutna u okviru procesa dediferencijacije maligno izmenjenih ćelija endometrijuma, već kao potencijalno kontinuiran događaj koji započinje malignom transformacijom. Interesantni rezultati koji su u skladu sa ovom idejom, su u našoj studiji uočeni u odnosu na visoku opaženu senzitivnost i specifičnost za vrednost Allred-ovog skora jednaku ili veću od 7. Za ovu graničnu vrednost uočena je pozitivna prediktivna vrednost 94.1%, i negativna prediktivna vrednost 59% u diferencijalnoj dijagnozi između malignih i benignih promena. Ovi nalazi koreliraju sa prethodno prijavljenim rezultatima o ulozi Allred-ovog skora kao prognostičkog biomarkera u karcinomima endometrijuma (Yunokawa, 2017).

Razlike u ekspresiji VEGF-A između endometrioidnog karcinoma i hiperplazije endometrijuma su pokazale značajnost ($p < 0.001$), dok je analizom povezanosti nivoa ekspresije VEGF-A pokazana značajna ($p < 0.05$) korelacija sa histološkim gradusom tumora. Ovakvi rezultati su delom bili u skladu sa prethodnim studijama koje su pokazivale niske nivoe ekspresije VEGF-A u hiperplastičnim, dok je povećana ekspresija pozitivno koorelirala sa procesom dediferencijacije u karcinomima endometrijuma i bila povezana sa češćim metastaziranjem i lošijom prognozom. Naši rezultati su pokazali da je izostanak ekspresije primećen u 95% hiperplazija, dok je odnos zastupljenosti karcinoma sa pozitivnom imunohistohemijskom reakcijom i onih bez pokazane ekspresije VEGF-A bio skoro potpuno ujednačen. Među VEGF-A pozitivnim karcinomima endometrijuma uočen je interesantan obrazac distribucije među tumorskim gradusima. Naime

suprotno prethodnim izveštajima studija naši rezultati su pokazali da je 61.1% tumora gradusa 1 bilo pozitivno, a 64.2% tumora gradusa 2 i 3 je pokazalo izostanak ekspresije. Ista studija navodi slične rezultate na delu uzorka ističući varijabilnost u ekspresiji u ovoj grupi tumora (Kamat, 2007).

Zbog važnosti neoangiogeneze u tumorskom rastu, uloženi su naponi da se razvije antiangiogena terapija za lečenje karcinoma endometrijuma, kao što su anti-VEGF monoklonska antitela (bevacizumab), solubilni VEGFR (aflibercept), inhibitori angiopoetin-Tie2 receptora (trebananib) i inhibitori tirozin kinaze (brivanib, cediranib, nintedanib, sunitinib i lenvatinib). Ipak, antiangiogena terapija je ograničena na male specifične grupe pacijenata, povezana je sa neželjenim efektima i mnogi pacijenti koji su prvobitno reagovali na ciljanu terapiju, vremenom razvijaju rezistenciju, što ukazuje na dalju potrebu za boljim razumevanjem mehanizama i faktora uključenih u angiogeni proces karcinoma endometrijuma (Roškar, 2021).

Okončana je prva faza kliničkih ispitivanja terapijske primene ALM-201, peptidnog derivata FKBPL, kod karcinoma jajnika i drugih uznapredovalih solidnih tumora i ALM-201 je dodeljen status *orphan drug* za karcinome jajnika od strane Uprave za hranu i lekove –FDA (eng. *Food and Drug Administration*) (El Helali, 2022). U grupi za ispitivanje bezbednosti nalazila su se dva slučaja karcinoma endometrijuma. Smatramo da naši rezultati mogu postaviti osnovu za potencijalna dalja ispitivanja uloge FKBPL i njegovih terapijskih derivata u eksperimentalnim studijama o karcinomima endometrijuma, sa obećavajućim potencijalom za primenu u kliničkoj praksi.

6.ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata našeg istraživanja možemo da izvedemo sledeće zaključke:

- Analizom ekspresije antiangiogenog FKBPL proteina pokazali smo statistički značajnu razliku između tkiva endometrioidnih karcinoma endometrijuma, sa slabim intenzitetom ili gubitkom ekspresije, u odnosu na uzorke benigne hiperplazije endometrijuma, sa jakim ili umeren intenzitetom ekspresije FKBPL
- Ispitivanjem povezanosti intenziteta ekspresije FKBPL i VEGF-A pokazana je značajna negativna korelacija u tkivima endometrioidnog karcinoma i hiperplazije endometrijuma
- Ispitivanjem povezanosti ekspresije FKBPL i ER α u tkivima endometrioidnog karcinoma i hiperplazije endometrijuma pokazali smo značajnu pozitivnu korelaciju u odnosu na intenzitet ekspresije, procentualnu zastupljenost ER α pozitivnih epitelih ćelija i Allred-ov skor, od kojih je Allred-ov skor pokazao najjaču korelaciju.
- Morfometrijskom analizom je uočena statistički značajna razlika povećane vaskularne gustine u tkivu strome endometrioidnog karcinoma u odnosu na stromu u uzorcima benigne hiperplazije endometrijuma.
- Rezultati našeg istraživanja pokazuju statistički značajnu negativnu korelaciju između intenziteta ekspresije FKBPL i nivoa vaskularne gustine endometrioidnih karcinoma i benignih hiperplazija endometrijuma.
- Ispitivanjem dijagnostičke tačnosti zaključili smo da intenzitet ekspresije FKBPL poseduje visok nivo senzitivnosti, specifičnosti, sa visokim pozitivnim i negativnim prediktivnim vrednostima u diferencijalnoj dijagnozi između endometrioidnog karcinoma i benigne hiperplazije endometrijuma.
- Ispitivanjem pouzdanosti rezultata dobijenih dvostruko slepom analizom pokazan je visok stepen unutrašnje konzistentnosti za vrednosti intenziteta ekspresije FKBPL, VEGF-A, kao i za vrednosti parametara ekspresije ER α , intenziteta, procentualne zastupljenosti ER α pozitivnih epitelih ćelija i Allred-ovog skora.
- Rezultati naše studije nisu pokazali statistički značajnu povezanost intenziteta ekspresije FKBPL sa histološkim gradusom, kliničkim stadijumom, dubinom invazije miometrijuma i prisustvom limfovaskularne invazije u grupi endometrioidnih karcinoma endometrijuma
- Analizom intenziteta ekspresije VEGF-A pokazana je statistički značajna razlika između tkiva endometrioidnog karcinoma i benigne hiperplazije endometrijuma, koja ukazuje na povećanu ekspresiju u malignim promenama.
- Analizom parametra nivoa ekspresije ER α , intenziteta, procentualne zastupljenosti ER α pozitivnih epitelih ćelija i Allred-ovog skora pokazana je statistički značajna razlika u ekspresiji ER α , koja ukazuje na viši nivo ekspresije ER α u hiperplastičnim u odnosu na tumorske promene.
- Ispitivanjem dijagnostičke tačnosti pokazan je visok nivo senzitivnosti, specifičnosti, pozitivne i negativne prediktivne vrednosti Allred-ovog skora u diferencijalnoj dijagnozi između endometrioidnog karcinoma i benigne hiperplazije endometrijuma. Najveća senzitivnost i specifičnost je uočena za vrednosti Allred-ovog skora jednakih ili većih od 7 .

- Dalje studije su potrebne da bi se utvrdilo da li se FKBPL može koristiti kao dijagnostički biomarker i kao potencijalni kandidat za razvoj ciljane antiangiogene terapije karcinoma endometrijuma.

LITERATURA

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2021. Atlanta: American Cancer Society; 2021. 1–72. (Suggested citation)

Annett S, Moore G, Short A, Marshall A, McCrudden C, Yakkundi A, Das S, McCluggage WG, Nelson L, Harley I, Moustafa N, Kennedy CJ, deFazio A, Brand A, Sharma R, Brennan D, O'Toole S, O'Leary J, Bates M, O'Riain C, O'Connor D, Furlong F, McCarthy H, Kissenpfennig A, McClements L, Robson T. FKBPL-based peptide, ALM201, targets angiogenesis and cancer stem cells in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2020 Feb;122(3):361-371.

Annett S, Moore G, Robson T. FK506 binding proteins and inflammation related signalling pathways; basic biology, current status and future prospects for pharmacological intervention. *Pharmacol Ther*. 2020 Nov;215:107623.

Backes FJ, Walker CJ, Goodfellow PJ, Hade EM, Agarwal G, Mutch D, et al. Estrogen receptor- α as a predictive biomarker in endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2016;141(2):312-7.

Bennett R, Yakkundi A, McKeen HD, McClements L, McKeogh TJ, McCrudden CM, et al. RALA-mediated delivery of FKBPL nucleic acid therapeutics. *Nanomedicine (Lond)*. 2015 Oct;10(19):2989-3001.

Beral V, Bull D, Reeves G. Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2005;365(9470):1543-51.

Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, et al, eds. TNM Classification of Malignant Tumours. 8th ed. Oxford, UK: Wiley; 2016.

Crosbie EJ, Kitson SJ, McAlpine JN, Mukhopadhyay A, Powell ME, Singh N. Endometrial cancer. *Lancet*. 2022 04 9;399(10333):1412-28.

Droog M, Nevedomskaya E, Dackus GM, Fles R, Kim Y, Hollema H, et al. Estrogen receptor α wields treatment-specific enhancers between morphologically similar endometrial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 02 21;114(8):E1316-E1325.

Dziobek K, Oplawski M, Grabarek BO, Zmarzły N, Tomala B, Halski T, et al. Changes in the Expression Profile of VEGF-A, VEGF-B, VEGFR-1, VEGFR-2 in Different Grades of Endometrial Cancer. *Curr Pharm Biotechnol*. 2019;20(11):955-63.

El Helali A, Plummer R, Jayson GC, Coyle VM, Drew Y, Mescallado N, et al. A first-in-human Phase I dose-escalation trial of the novel therapeutic peptide, ALM201, demonstrates a favourable safety profile in unselected patients with ovarian cancer and other advanced solid tumours. *Br J Cancer*. 2022 07;127(1):92-101.

Fadare, O. (Ed.). (2019). *Precancerous lesions of the gynecologic tract: Diagnostic and molecular genetic pathology*. Springer International Publishing.

FIGO Cancer Report. Cancer of the corpus uteri. *Int J Gynecol Obstet*. 2018;143(suppl 2):37-50

Gottardis MM, Robinson SP, Satyaswaroop PG, Jordan VC. Contrasting actions of tamoxifen on endometrial and breast tumor growth in the athymic mouse. *Cancer Res*. 1988 Feb 15;48(4):812-5.

Hapangama DK, Kamal AM, Bulmer JN. Estrogen receptor β : the guardian of the endometrium. *Hum Reprod Update*. 2015 Mar-Apr;21(2):174-93.

Häring J, Schüler S, Lattrich C, Ortmann O, Treeck O. Role of estrogen receptor β in gynecological cancer. *Gynecol Oncol*. 2012 Dec;127(3):673-6.

Herrington CS, (ed.), *Female Genital Tumours*, 5th ed.; Organisation Mondiale de la Santé, Centre International de recherche sur le Cancer, Eds.; World Health Organization Classification of Tumours; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2020.

Holland CM, Day K, Evans A, Smith SK. Expression of the VEGF and angiopoietin genes in endometrial atypical hyperplasia and endometrial cancer. *Br J Cancer*. 2003;89(5):891-8.

Iguchi Y, Ito YM, Kataoka F, Nomura H, Tanaka H, Chiyoda T, Hashimoto S, Nishimura S, Takano M, Yamagami W, Susumu N, Aoki D, Tsuda H. Simultaneous analysis of the gene expression profiles of cancer and stromal cells in endometrial cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014 Sep;53(9):725-37.

Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut". Maligni tumori u Republici Srbiji 2020. 2022 [Poslednji put pristupljeno 29.09.2022.]. Dostupno na: <https://www.batut.org.rs/download/publikacije/MaligniTumoriuRepubliciSrbiji2020.pdf>

Kamat A.A., Merritt W.M., Coffey D., Lin Y.G., Patel P.R., Broaddus R., Nugent E., Han L.Y., Landen C.N., Jr, Spannuth W.A., Lu C., Coleman R.L., Gershenson D.M., Sood A.K. Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. *Clin. Cancer Res*. 2007;13(24):7487–7495.

Kotowicz B, Fuksiewicz M, Jonska-Gmyrek J, Berezowska A, Radziszewski J, Bidzinski M, et al. Clinical significance of pretreatment serum levels of VEGF and its receptors, IL- 8, and their prognostic value in type I and II endometrial cancer patients. *PLoS One*. 2017;12(10):e0184576.

Lee SY. Tailored Therapy Based on Molecular Characteristics in Endometrial Cancer. *Biomed Res Int*. 2021; 2021:2068023.

Martin JD, Hähnel R, McCartney AJ, Woodings TL. The effect of estrogen receptor status on survival in patients with endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 1983 Oct 1;147(3):322-4.

McClements L, Annett S, Yakkundi A, O'Rourke M, Valentine A, Moustafa N, Alqudah A, Simões BM, Furlong F, Short A, McIntosh SA, McCarthy HO, Clarke RB, Robson T. FKBPL and its peptide derivatives inhibit endocrine therapy resistant cancer stem cells and breast cancer metastasis by downregulating DLL4 and Notch4. *BMC Cancer*. 2019 Apr 11;19(1):351

McKeen HD, Byrne C, Jithesh PV, Donley C, Valentine A, Yakkundi A, O'Rourke M, Swanton C, McCarthy HO, Hirst DG, Robson T. FKBPL regulates estrogen receptor signaling and determines response to endocrine therapy. *Cancer Res*. 2010 Feb 1;70(3):1090-100.

McKeen HD, Brennan DJ, Hegarty S, Lanigan F, Jirstrom K, Byrne C, Yakkundi A, McCarthy HO, Gallagher WM, Robson T. The emerging role of FK506-binding proteins as cancer biomarkers: a focus on FKBPL. *Biochem Soc Trans*. 2011 Apr;39(2):663-8.

Miyamoto T, Shiozawa T. Two-sided role of estrogen on endometrial carcinogenesis: stimulator or suppressor. *Gynecol Endocrinol*. 2019;35(5):370-5.

Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, Kuhn C, Balle A, Kriegel S, Kupka MS, Friese K. Immunohistochemical analysis of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in normal human endometrium. *Acta Histochem*. 2004;106(3):245-52.

Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, Kuhn C, Kriegel S, Kupka MS, Friese K. Normal and malignant human endometrium express immunohistochemically estrogen receptor alpha (ER-alpha), estrogen

receptor beta (ER-beta) and progesterone receptor (PR). *Anticancer Res.* 2005 May-Jun;25(3A):1679-86.

Navaratnarajah R, Pillay OC, Hardiman P. Polycystic ovary syndrome and endometrial cancer. *Semin Reprod Med.* 2008 Jan;26(1):62-71

Nelson L, McKeen HD, Marshall A, Mulrane L, Starczynski J, Storr SJ, Lanigan F, Byrne C, Arthur K, Hegarty S, Ali AA, Furlong F, McCarthy HO, Ellis IO, Green AR, Rakha E, Young L, Kunkler I, Thomas J, Jack W, Cameron D, Jirstrom K, Yakkundi A, McClements L, Martin SG, Gallagher WM, Dunn J, Bartlett J, O'Connor D, Robson T. FKBPL: a marker of good prognosis in breast cancer. *Oncotarget.* 2015 May 20;6(14):12209-23.

Opric M i sar., Specijalna onkologija, Elit medica, MB Grafic, Beograd, ISBN: 86-7222-036-6, 2004

Park J., Lee J, Lee Y, Shim S, Suh D, Kim J. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2021. *J Gynecol Oncol.* 2022;33(2):e43.

Robson T, James IF. The therapeutic and diagnostic potential of FKBPL; a novel anticancer protein. *Drug Discov Today.* 2012 Jun;17(11-12):544-8.

Rodriguez AC, Blanchard Z, Maurer KA, Gertz J. Estrogen Signaling in Endometrial Cancer: a Key Oncogenic Pathway with Several Open Questions. *Horm Cancer.* 2019 Jun;10(2-3):51-63.

Roškar L, Roškar I, Rižner TL, Smrkolj Š. Diagnostic and Therapeutic Values of Angiogenic Factors in Endometrial Cancer. *Biomolecules.* 2021;12(1):7.

Saarelainen SK, Staff S, Peltonen N, Lehtimäki T, Isola J, Kujala PM, et al. Endoglin, VEGF, and its receptors in predicting metastases in endometrial carcinoma. *Tumour Biol.* 2014 ;35(5):4651-7.

Saimi M, Moriya S, Li ZL, Miyaso H, Nagahori K, Kawata S, et al. Cytonuclear Estrogen Receptor Alpha Regulates Proliferation and Migration of Endometrial Carcinoma Cells. *Tokai J Exp Clin Med.* 2021 ;46(1):7-16.

Soslow RA, Tornos C, Park KJ, Malpica A, Matias-Guiu X, Oliva E, et al. 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 ;38 Suppl 1:S64-S74.

The Human Protein Atlas - Tissue expression of FKBPL - Staining in endometrium. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000204315-FKBPL/tissue/endometrium> (accessed 2022-08-04).

The Human Protein Atlas - Expression of FKBPL in endometrial cancer. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000204315-FKBPL/pathology/endometrial+cancer> (accessed 2022-08-04).

Valentine A, O'Rourke M, Yakkundi A, Worthington J, Hookham M, Bicknell R, et al. FKBPL and peptide derivatives: novel biological agents that inhibit angiogenesis by a CD44-dependent mechanism. *Clin Cancer Res.* 2011 Mar 1;17(5):1044-56.

Weston G, Rogers PA. Endometrial angiogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2000;14(6):919-36.

Weiderpass E, Adami HO, Baron JA, Magnusson C, Bergström R, Lindgren A, Correia N, Persson I. Risk of endometrial cancer following estrogen replacement with and without progestins. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jul 7;91(13):1131-7

Yakkundi A, Bennett R, Hernández-Negrete I, Delalande JM, Hanna M, Lyubomska O, et al. FKBPL is a critical antiangiogenic regulator of developmental and pathological angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Apr;35(4):845-54.

Yunokawa, M.; Yoshida, H.; Watanabe, R.; Noguchi, E.; Shimomura, A.; Shimoi, T.; Yonemori, K.; Shimizu, C.; Fujiwara, Y.; Tamura, K. Allred Score Is a Promising Predictor of Prognosis and Medroxyprogesterone Acetate Efficacy in Patients with Endometrial Cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017, 80 (1), 127–134.

Biografija kandidata

Dr Danilo Obradović je rođen u Beogradu 26.07.1987., gde je završio osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet je upisao 2006., a diplomirao 2012. godine sa prosečnom ocenom 9.30. Od 2013. godine je zaposlen na Institutu za patologiju "Dr Đorđe Joannović" Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, gde je deo tima za oblast ginekološke patologije, profesora Dejana Oprića. U zvanje saradnika u nastavi za užu naučnu oblast patologija izabran je 2013. godine, a 2015. godine je izabran u zvanje asistenta. Za svoj pedagoški i nastavni rad je dobio najviše ocene studenata. 2017. godine je u okviru naučno-stručnog usavršavanja boravio u Centru za eksperimentalnu medicinu Queens Univerziteta u Belfastu, gde je njegov rad bio usmeren na patologiju posteljice, eksperimentalni rad na temu preeklampsije i angiogeneze, i razvijanja bioloških banki tkiva, pod mentorstvom prof. dr Lane McClements. Specijalistički ispit je položio u januaru 2019. godine sa najvišom ocenom, stekavši zvanje specijalista patologije. Iste godine je boravio u univerzitetskoj bolnici "Narodni Front" u okviru edukacije iz oblasti ginekološke citologije. Doktorske studije na modulu Biologija tumora i oksidativna oboljenja je upisao 2017. godine. Učesnik je na projektu koji finansira MNTR od 2012. godine. Autor je ili koautor 9 naučnih publikacija koje su štampane u celini u časopisima indeksiranim u Journal Citation Reports listi.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ др Данило Обрадовић _____

Број индекса _____ ММ-2017 5182 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ АНТИАНГИОГЕНОГ ФКБПЛ ПРОТЕИНА, ВАСКУЛАРНОГ ЕНДОТЕЛНОГ ФАКТОРА РАСТА И ЕСТРОГЕНОГ РЕЦЕПТОРА У ЕНДОМЕТРИОИДНОМ КАРЦИНОМУ УТЕРУСА И БЕНИГНОЈ ХИПЕРПЛАЗИЈИ ЕНДОМЕТРИЈУМА

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 07.10.2022.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора др Данило Обрадовић

Број индекса ММ-2017 5182

Студијски програм Биологија тумора и оксидативна обољења

Наслов рада АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ АНТИАНГИОГЕНОГ ФКБПЛ ПРОТЕИНА,
ВАСКУЛАРНОГ ЕНДОТЕЛНОГ ФАКТОРА РАСТА И ЕСТРОГЕНОГ РЕЦЕПТОРА У
ЕНДОМЕТРИОИДНОМ КАРЦИНОМУ УТЕРУСА И БЕНИГНОЈ ХИПЕРПЛАЗИЈИ
ЕНДОМЕТРИЈУМА

Ментори Проф. др Дејан Опрић и prof. dr Lana McClements

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду

Потпис аутора

У Београду, 07.10.2022.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ АНТИАНГИОГЕНОГ ФКБПЛ ПРОТЕИНА, ВАСКУЛАРНОГ ЕНДОТЕЛНОГ ФАКТОРА РАСТА И ЕСТРОГЕНОГ РЕЦЕПТОРА У ЕНДОМЕТРИОИДНОМ КАРЦИНОМУ УТЕРУСА И БЕНИГНОЈ ХИПЕРПЛАЗИЈИ ЕНДОМЕТРИЈУМА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA) (Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 07.10.2022.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.