

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 17.11.2022. godine, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom

„Analiza ekspresije antiangiogenog FKBPL proteina, vaskularnog endotelnog faktora rasta i estrogenog receptora u endometrioidnom karcinomu uterusa i benignoj hiperplaziji endometrijuma“

kandidata dr Danila Obradovića, zaposlenog u Institutu za patologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor 1 je prof. dr Dejan Oprić, mentor 2 je prof. dr Lana McClements.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Svetislav Tatić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Sofija Glumac, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Biserka Vukomanović, Medicinski fakultet vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Danila Obradovića napisana je na ukupno 80 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i reference. U disertaciji se nalazi ukupno 65 tabela i 35 slika. Doktorska disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** su opisane osnovne epidemiološke karakteristike, faktori rizika, prekancerozne lezije, kao i klinička slika karcinoma endometrijuma, a definisani su i histopatološki tipovi i sumirane su karakteristike ključnih prognostičkih faktora, tumorskog gradusa i stadijuma bolesti, kao i karakteristike molekularne klasifikacije karcinoma endometrijuma. Detaljno su opisane struktura, karakteristike i značaj FKBPL, a dat je i pregled ekspresije antiangiogenog FKBPL proteina, u različitim malignim tumorima u literaturi. Dat je i pregled osnovnih podataka o angiogenezi i njenoj povezanosti sa tumorskim procesima, kao i pregled uloge centralnog pro-angiogenog vaskularnog endotelnog faktora rasta –A i značaja estrogenog receptora alfa u rastu, perzistiranju i kancerogenezi karcinoma endometrijuma. Jasno je naglašeno da nema dovoljno podataka u literaturi o ekspresiji antiangiogenog FKBPL proteina u endometrioidnim karcinomima endometrijuma.

Ciljevi rada su precizno formulisani. 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.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da su u ovom istraživanju korišćene dve grupe uzoraka. Jednu grupu su činili parafinski kalupi tkivnih uzoraka endometrioidnih karcinoma endometrijuma pacijentkinja koje su podvrgnute histerektomiji, dok su drugu grupu uzoraka činili parafinski kalupi slučajeva benigne hiperplazije endometrijuma pacijentkinja dijagnostikovanih nakon eksplorativne kiretaže kavuma uterusa. Uzorci su dobijeni iz Kliničko-bolničkog centra "Zemun" u Beogradu u periodu između 2010. i 2020. godine. Jasno su definisani kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz studije. Jasno je opisana priprema tkivnih uzoraka i imunohistohemijska analiza. Opisane su i metode statističke analize dobijenih podataka. Istraživanje je sprovedeno uz saglasnost Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U poglavlju **rezultati**, detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati. Ilustrovani su velikim brojem tabela i slika, a predstavljeni su i rezultati statističke analize podataka.

Diskusija je napisana jezgrovito, jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. Jasno su interpretirani dobijeni rezultati i diskutovan je njihov značaj u kontekstu patologije karcinoma endometrijuma.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Direktno je korišćeno i citirano 47 **referenci**.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije dr Ivane Savić, utvrđeno podudaranje teksta iznosi 7%. Ovaj stepen podudarnosti je posledica podudaranja složenih imena pojmova, tehničkih parametara koji se koriste u istraživanjima, nekih citata, opštih mesta i podataka, slučajnih preklapanja nekih od fraza i brojeva, ili sličnosti u primeni statističkih testova, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

C) Kratak opis postignutih rezultata

Dobijeni rezultati pokazali su postojanje statistički značajne razlike intenziteta ekspresije antiangiogenog FKBPL proteina, između tkiva endometrijuma sa benignom hiperplazijom i tkiva endometrioidnog karcinoma endometrijuma. Naime pokazan je nizak nivo ili potpuni gubitak imunohistohemijske ekspresije FKBPL u endometrioidnom karcinomu, za razliku od benignih promena endometrijuma u kojima je uočena ekspresija umerenog i jakog intenziteta.

Ispitivanjem dijagnostičke tačnosti pokazano je 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. Analizom intenziteta ekspresije VEGF-A pokazana je statistički značajna razlika između tkiva endometrioidnog karcinoma i benigne hiperplazije endometrijuma. Rezultati su pokazali povećanje intenziteta ekspresije u malignim promenama. Ispitivanjem povezanosti intenziteta ekspresije FKBPL i VEGF-A pokazana je značajna negativna korelacija u tkivima endometrioidnog karcinoma i hiperplazije endometrijuma. Analizom parametara nivoa ekspresije ER α , intenziteta, procentualne zastupljenosti ER α pozitivnih epitelnih 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. Ispitivanjem povezanosti ekspresije FKBPL i ER α u tkivima endometrioidnog karcinoma i hiperplazije endometrijuma pokazana je značajnu pozitivna korelacija u odnosu na intenzitet ekspresije, procentualnu zastupljenost ER α pozitivnih epitelnih ćelija i Allred-ov skor. Najveći stepen povezanosti je pokazan korelacijom intenziteta ekspresije FKBPL sa vrednostima Allred-ovog skora. 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 epitelnih ćelija i Allred-ovog skora. Morfometrijskom analizom je uočena statistički značajna razlika vaskularne gustine u tkivu strome endometrioidnog karcinoma u odnosu na stromu u uzorcima benigne hiperplazije endometrijuma. Značajan porast vaskularne gustine je uočen u tumorskom tkivu u odnosu na tkivo benignih promena endometrijuma. Rezultati istraživanja su pokazali statistički značajnu negativnu korelaciju između intenziteta ekspresije FKBPL i nivoa vaskularne gustine u uzorcima endometrioidnih karcinoma i benignih hiperplazija endometrijuma. Rezultati 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.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Na osnovu analize imunohistohemijskog bojenja, ova doktorska disertacija je pokazala da je u 97,5% uzoraka benigne hiperplazije endometrijuma prisutan jak ili umeren intenzitet ekspresije FKBPL, dok je nasuprot ovom rezultatu, slab intenzitet, ili gubitak ekspresije, uočen u 93,3% endometrioidnih karcinoma. Ekspresija antiangiogenog FKBPL proteina je uočena u epitelnim ćelijama žlezda endometrijuma sa benignom hiperplazijom, kao i u epitelnim ćelijama tumorskih žlezda endometrioidnog karcinoma. Podaci o ekspresiji i ulozi FKBPL-a u karcinomima endometrijuma su izuzetno oskudni u literaturi. Pojedinačna eksperimentalna studija, u kojoj su Iguchi i saradnici ispitali genetski profil karcinoma endometrijuma, navodi da je gen koji kodira FKBPL ekspresiran unutar stromalnih ćelija karcinomima endometrijuma. Ova studija je istovremeno analizirala mikrodisekovanu epitelnu komponentu tumorskog tkiva karcinoma endometrijuma, i u rezultatima nisu navedeni podaci o ekspresiji gena koji kodira FKBPL (Iguchi i sar., 2014). Prema dostupnim relevantnim izvorima podataka, u okviru centralizovane baze atlasa humanih proteina (eng. *The Human Protein Atlas*) imunohistohemijska ekspresija FKBPL je pronađena u epitelu žlezda endometrijuma, pokazujući citoplazmatsku, membransku i nuklearnu ekspresiju,

umerenog i visokog intenziteta, sa karakteristično izraženom luminalnom pozitivnošću u tkivima gde je prisutan visok intenzitet ekspresije FKBPL. Prema ovom relevantnom izvoru u ćelijama strome endometrija nije zabeležena ekspresija (The Human Protein Atlas, Tissue expression of FKBPL, n.d.). Ovi nalazi su u skladu sa rezultatima doktorske disertacije koji se odnose na tkivo endometrija sa benignom hiperplazijom. Isti izvor navodi podatke o ekspresiji FKBPL u tumorskim ćelijama karcinoma endometrija, i oni ukazuju da ekspresija, u ćelijama žlezdanog epitela karcinoma endometrija, varira od slučajeva bez ekspresije do pojave ekspresije niskog i retko umerenog intenziteta. Rezultati doktorske disertacije koji se odnose na intenzitet ekspresije FKBPL u žlezdama endometrioidnog karcinoma su u saglasnosti sa ovim nalazom. U bazi podataka ovog relevantnog izvora nije dostupna informacija o ekspresiji FKBPL u stromalnim ćelijama karcinoma endometrija (The Human Protein Atlas, Expression of FKBPL in endometrial cancer, n.d.).

Rezultati doktorske disertacije koji pokazuju statistički značajnu razliku intenziteta nivoa ekspresije FKBPL između endometrioidnog karcinoma i hiperplazije endometrija su u skladu sa studijama koje analiziraju ulogu ekspresije FKBPL prateći njegov uticaj u bazičnim osobinama biološkog ponašanja tumorskih ćelija. Valentine i saradnici su ispitivanjem nivoa FKBPL u medijumu kultura ćelija zdravih pneumocita i endotelnih ćelija, u odnosu na medijum u kulturama ćelija karcinoma dojke, pokazali 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 (Valentine i sar., 2011). Ispitivanje prognostičkog značaja ekspresije FKBPL nije uočena povezanost sa najznačajnijim prognostičkim faktorima endometrioidnog karcinoma, tumorskim gradusom, stadijumom, dubinom invazije miometrija i prisustvom limfovaskularne invazije. Ovi nalazi su u suprotnosti sa rezultatima studije Nelson i saradnika koji su pokazali značaj nižeg nivoa ekspresije FKBPL kod pacijenata sa karcinomom dojke kao nezavisnog prognostičkog faktora kraćeg perioda preživljavanja, kao i značaj više ekspresije FKBPL kao prediktora intervala bez relapsa u grupi pacijentkinja sa karcinomima dojke sa visokom ekspresijom estrogenog receptora (Nelson, 2015). Izostatak korelacije nivoa ekspresije FKBPL, sa poznatim prognostičkim faktorima karcinoma endometrija može biti posledica ograničavajućih faktora studije, uključujući da je većina karcinoma bila niskog gradusa, kao i stadijuma I, što čini grupu tumora srodnog biološkog ponašanja.

Analizom intenziteta ekspresije VEGF-A pokazana je značajna razlika između tkiva endometrioidnog karcinoma i benigne hiperplazije endometrija, koja ukazuje na povećanu ekspresiju u malignim promenama. Dziobek i saradnici navode postojanje pozitivne korelacije nivoa imunohistohemijske ekspresije VEGF-A sa histološkim gradusom EC (Dziobek i sar., 2019). Holland i saradnici navode odsutvo ekspresije VEGF-A u benignim promenama endometrija, nasuprot rastu ekspresije u karcinomu endometrija (Holland, 2003). Ispitivanjem povezanost intenziteta ekspresije FKBPL i VEGF-A u tkivima endometrioidnog karcinoma i hiperplazije endometrija pokazano je da je u 91.1% slučajeva koji su imali umeren ili jak intenzitet ekspresije FKBPL pronađeno odsustvo ekspresije VEGF-A. Prema prethodnim izveštajima VEGF ne utiče na ekspresiju FKBPL, što je eksperimentalno demonstrirano, sugerišući različite mehanizme dejstva na angiogenezu (Yakkundi i sar., 2015). U svetlu ovih izveštaja uočena negativna korelacija pokazana 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 endometrija. Uočena razlika u ekspresiji estrogenog receptora, koja ukazuje na viši nivo ekspresije u hiperplastičnim u odnosu na tumorske promene, je u skladu sa studijom Backes i

saradnika koja pokazuje gubitak ekspresije estrogenog receptora u karcinoma endometrija kao biomarker lošije prognoze (Backes i sar., 2016).

Budući da je FKBPL deo kompleksa košaperona HSP90/ER α , čija je povećana ekspresiju FKBPL u kulturama ćelija karcinoma dojke je praćena povećanom zavisnošću tumorskog rasta od estrogene stimulacije i većom senzitivnošću tumora na antiestrogenu terapiju tamoksifenom McKeen i saradnici su pokazali da FKBPL učestvuje u regulaciji ekspresije estrogenog receptora i da je visoka ekspresija FKBPL je praćena smanjenjem nivoa ER α u kulturama ćelija karcinoma dojke (McKeen i sar., 2010). Ovakvi nalazi su sa jedne strane u suprotnosti sa rezultatima doktorske disertacije koji su pokazali pozitivnu korelaciju između ekspresije FKBPL i estrogenog receptora u endometrioidnim karcinomima i benignim hiperplazijama endometrija. Potencijalno objašnjenje ovih razka se može naći u specifičnosti efektorskih i regulatornih mehanizama ER α koje su ustanovili Gottardis i saradnici, a se odnosi na različito i tkivno specifično dejstvo endokrine terapije Tamoksifenom u tkivu dojke i u endometriju (Gottardis i sar., 1988). Uloga FKBPL kao negativnog regulatora rasta tumora, metastaziranja i angiogeneze ustanovljena je u studijama karcinoma dojke. Mc Clements i saradnici su prikazali inhibitorno dejstvo FKBPL i njegovih derivata na rast matičnih ćelija raka dojke pokazujući da FKBPL i njegov peptidni derivat ALM201 smanjuju migraciju i invaziju ćelija karcinoma dojke, kao i da inhibiraju rast mamosfera ćelija karcinoma dojke otpornih na endokrinu terapiju (McClements i sar., 2019). Studija Annett i saradnika je pokazala da terapeutske peptidni derivati FKBPL-a stimulišu diferencijaciju ćelija karcinoma jajnika i smanjuju njihov broj, kao i da odlažu inicijaciju tumora i rast visoko vaskularizovanih ksenotransplantata putem poremećaja procesa angiogeneze (Annett i sar., Feb 2020). Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali značajnu negativnu korelaciju između intenziteta ekspresije FKBPL i nivoa vaskularne gustine, što je u skladu sa dosadašnjim studijama kojima je utvrđen antiangiogeni efekat FKBPL.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Obradović DD, Milić NM, Miladinović N, McClements L, Opić DM (2022). Loss of Expression of Antiangiogenic Protein FKBPL in Endometrioid Endometrial Carcinoma: Implications for Clinical Practice. Medicina (Kaunas, Lithuania), 58(10), 1330. doi: 10.3390/medicina58101330 (M22, IF 2.948)

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Analiza ekspresije antiangiogenog FKBPL proteina, vaskularnog endotelnog faktora rasta i estrogenog receptora u endometrioidnom karcinomu uterusa i benignoj hiperplaziji endometrija“ dr Danila Obradovića, kao jedan od retkih radova o ovakvoj tematici u populaciji pacijentkinja sa endometrioidnim karcinomom predstavlja originalni naučni doprinos istraživanjima koja se odnose na potencijalni značaj ekspresije proteina sa ustanovljenom antiangiogenom i antineoplastičnom ulogom, FKBPL. Ovaj rad, pored toga što predstavlja prvu naučnu publikaciju o imunohistohemijskoj ekspresiji FKBPL u endometrioidnom karcinomu i benignoj hiperplaziji endometrija, pruža i uvid u povezanost ekspresije FKBPL sa centralnim proangiogenim faktorom rasta VEGF-A, kao i centralnim faktorom u procesu kancerogeneze endometrija, estrogenim receptorom-alfa.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučno-nastavnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Danila Obradovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 24.11.2022.

Mentori:

Prof. dr Dejan Opić

Prof. dr Lana McClements

Članovi Komisije:

Prof. dr Svetislav Tatić

Prof. dr Sofija Glumac

Prof. dr Biserka Vukomanović