

**НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На седници **Наставно-научног већа** Медицинског факултета у Београду, одржаној дана 12. 11. 2024. године, број 19/І-4/3-АЂР, именована је комисија за оцену завршене докторске дисертације под насловом:

„Маркери епително-мезенхималне транзиције у муцинозном колоректалном карциному”

кандидата др Александре Ђикић Ром, запослене у Служби за патологију, патохистологију и медицинску цитологију Универзитетског клиничког центра Србије у Београду.

| Име и презиме ментора | Звање | Научна област | Установа у којој је запослен |
|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------------------|
| др Горан Баришић | Редовни професор | Хирургија | МФУБ |
| др Александра Николић | Научни саветник | Молекуларна биологија | ИМГГИ |

Комисија за оцену завршене докторске дисертације именована је у саставу:

| Име и презиме члана комисије | Звање | Научна област | Установа у којој је запослен |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------------|
| др Велимир Марковић | Редовни професор | Хирургија | МФУБ |
| др Радмила Јанковић | Ванредни професор | Патологија | МФУБ |
| др Сандра Драгичевић | Виши научни сарадник | Молекуларна биологија | ИМГГИ |
| др Јована Росић Стојковић | Научни сарадник | Молекуларна генетика | МФУБ |
| др Миљан Крстић | Редовни професор | Патологија | МФ Ниш |

На основу анализе приложене докторске дисертације, комисија за оцену завршене докторске дисертације једногласно подноси Научном већу Медицинског факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација др Александре Ђикић Ром написана је на укупно 106 страна и подељена је на следећа поглавља: увод, циљеви истраживања, материјал и методе, резултати, дискусија, закључци и литература. У дисертацији се налазе укупно 62 табеле, 33 графикана и 16 слика. Докторска дисертација садржи сажетак на српском и

енглеском језику, податке о комисији, биографију кандидата, прилог, списак скраћеница коришћених у тексту и списак објављених радова.

У **уводу** су дати најзначајнији подаци релевантни за научну тематику докторске дисертације. У првој целини детаљно су приказани етиологија, епидемиологија, генетички и средински фактори ризика за настанак колоректалног карцинома (енг. *Colorectal Cancer*, CRC), као и до сада познате информације о карциному колоректума са раним испољавањем (енг. *Early-Onset Colorectal Cancer*, EO-CRC), карциногези и путевима колоректалне карциногезе. Поред тога, посебна пажња је посвећена патохистолошкој (ПХ) класификацији CRC, у оквиру које су наведене специфичности најчешће дијагностикованих аденокарцинома (AC) са акцентом на карактеристике муцинозног подтипа (MAC). Дате су и најважније информације које се тичу дијагностике, параметара ПХ извештаја, прогностичких фактора и лечења колоректалног карцинома. У оквиру друге целине истакнута је важност епително-мезенхималне транзиције (EMT) у патолошким адаптационим процесима и детаљно су приказани механизми и сигнални путеви укључени у овај процес, а наглашена је потреба за проналажењем нових молекуларних биомаркера EMT који би унапредили лечење пацијената са CRC. Истакнута је и важност експресије мембранског (MI) и цитоплазматског (CI) E-кадхерина и Виментина у процесу EMT, док је у последњој целини увода приказан значај AKR1B1 у процесу EMT.

Циљеви рада су прецизно дефинисани и састоје се из три целине: 1) одређивање статуса EMT кроз мерење односа експресије E-кадхерина (MI и CI) и Виментина у групама пацијената са EO-CRC код MAC и AC, као и његов прогностички значај; 2) испитивање корелације нивоа експресије MUC1 и AKR1B1 и присуства варијанти у генима *KRAS* и *BRAF* код EO-CRC са муцинозним фенотипом и статусом EMT; 3) испитивање повезаности клиничко-патолошких параметара са муцинозним фенотипом и статусом EMT и њихов прогностички значај.

У поглављу **материјал и методе** је наведено да се ради о ретроспективној студији којом је обухваћено 106 пацијената млађих од 45 година у тренутку дијагностиковања болести (EO-CRC) који су подвргнути хируршкој ресекцији примарног CRC на Клиници за дигестивну хирургију, Универзитетског клиничког центра Србије у периоду од јануара 2006. до јуна 2020. године. За анализу су коришћени архивски узорци (ПХ извештаји и ткивни парафински блокови), а студија је спроведена у складу са смерницама Хелсиншке декларације и одобрена од стране Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Београду (1322/VII-14, 8. јул 2021). Пацијенти су након ПХ прегледа подељени у две категорије, MAC и AC, на основу хистолошког типа тумора. Статус EMT (однос нивоа експресије E-кадхерина (MI и CI) и Виментина), као и ниво експресије MUC1 и AKR1B1 одређивани су имунохистохемијским методама. Мутације одабраних региона гена *KRAS* и *BRAF* одређиване су методом секвенцирања ДНК. Статистичким тестовима је анализирана повезаност између клиничких и ПХ параметара пацијената са MAC и AC и интензитетом експресије маркера EMT (E-кадхерин (MI и CI) и Виментин), MUC1 и AKR1B1 у циљу повезивања муцинозне хистологије са појединим прогностичким и предиктивним факторима.

У поглављу **резултати** детаљно су описани и јасно представљени сви добијени резултати.

Дискусија је написана јасно и прегледно, уз приказ података других истраживања са упоредним прегледом добијених резултата докторске дисертације.

Закључци сажето приказују најважније налазе који су проистекли из резултата рада.

Коришћена **литература** садржи списак од 273 референце.

Б) Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Маркери епително-мезенхималне транзиције у муцинозном колоректалном карциному”, аутора Александре Б. Ђикић Ром, констатује се да утврђено подударање текста износи 8%. Овај степен подударности последица је личних имена, афилијација ментора, термина на енглеском језику, методолошких протокола, општих појмова и фраза које су типичне за проблематику која је била предмет докторске дисертације, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду („Гласник Универзитета у Београду“, број 204/18).

Ц) Кратак опис постигнутих резултата

Резултати су показали значајно већи Е-кадхерин (СI) скор ($p=0,004$), вишу експресију MUC1 ($p<0,001$), лошију диферентованост ($p=0,002$), узнатредовали стадијум туморске болести ($p=0,004$), чешће захватање десног колона од других туморских локализација ($p=0,039$), као и значајно више R1 ресекција ($p=0,007$) у групи муцинозних аденокарцинома у поређењу са немучинозним туморима. MAC са већом аберантном експресијом Е-кадхерина (СI) имали су виши стадијум туморске болести у односу на AC (28,2% насупрот 5,7% стадијума IV). Пацијенти са метастатским стадијумом имали су значајно краће преживљавање у поређењу са пацијентима стадијума I-III, без обзира на хистолошки тип ($p<0,001$). Пацијенти са TSR-H (енг. *tumor stroma ratio*, TSR; TSR-high/low, TSR-H/L) у групи MAC имали су значајно боље преживљавање у односу на пацијенте са TSR-L ($p=0,046$). Анализа генетичке варијабилности у оквиру егзона 2 *KRAS* гена детектовала је код укупно 8 пацијената (20%) 5 несинонимних супституција на кодонима 12 и 13 које доводе до промена у аминокиселинском ланцу *KRAS* протеина - G12S и G12V код по једног и G12D, G12C и G13D код по 2 пацијента. Генотипизација егзона 15 *BRAF* гена секвенцирањем туморских ткива показала је одсуство варијабилности у оквиру овог региона *BRAF* гена. На основу вредности Е-кадхерина и Виментина пацијенти су класификовани у две категорије тумора - Епителне (Е) и

Мезенхималне (М), а значајно боља диферентованост ($p=0,035$), као и ниже туморско пупљење (енг. *tumor budding*, Bd) ($p<0,001$) били су присутни код Е тумора у односу на М туморе. Резултати су такође показали да је MUC1 независан предиктор диференцијације тумора (odds ratio (OR) од 3,312, 95% CI (1,418–7,737); $p=0,006$). Тумори са повећаном експресијом Е-кадхерина (CI) имају 2,982 пута већу вероватноћу да имају муцинозну хистологију (95% CI (1,130–7,868); $p=0,027$), повећање Е-кадхерина (CI) је негативно повезано са туморским градусом (TG) (OR од 0,228, 95% CI (0,072–0,722); $p=0,012$), док је Виментин идентификован као независни предиктор Bd (OR од 2,738, 95% CI (1,519–4,934); $p=0,001$). Такође, укупно преживљавање (енг. *overall survival*, OS) пацијената у групама Е и М тумора било је значајно боље код пацијената са нижим TG, TSR-Н, локално ограниченим/узнапредовалим туморима, као и нижом експресијом MUC1, с тим да је та разлика у свим случајевима била значајнија у групи Е тумора ($p=0,009$; $p=0,029$; $p=0,013$; $p=0,134$; респективно).

Д) Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима из литературе

Упркос значају ЕМТ за клиничко лечење, њен потенцијални значај у специфичним хистолошким подтипима карцинома је и даље неистражен. Иако је доказано да су муцини укључени у процес ЕМТ и подстичу популације карциномских матичних ћелија код различитих типова карцинома, ово је једна од првих студија која је истраживала ЕМТ у муцинозној хистологији. Претходна истраживања показала су да је повећана експресија MUC1 предиктор лоше прогнозе и OS у CRC јер је у корелацији са вишим TNM стадијумом, дубином инвазије, лимфонодалним и удаљеним метастазама (Ли и сар, 2019. и Лее и сар, 2013). Имунохистохемијско одређивање његове експресије у тумору може бити значајно за одабир оптималне стратегије лечења, те је идентификован као значајан маркер за дијагностику CRC и имунотерапију (Ли и сар, 2019. и Гуо и сар, 2018). У овој дисертацији експресија MUC1 је била статистички значајно већа код MAC у поређењу са AC, што је и очекивани резултат, а показано је да је MUC1 независан предиктор диференцијације тумора.

Пацијенти са EO-CRC MAC имали су статистички значајно већу експресију Е-кадхерина (CI) у поређењу са пацијентима са хистологијом немучинозног тумора. Претходне студије су показале да аберантна експресија Е-кадхерина (CI) може бити показатељ повећане вероватноће за настанак метастаза (Елзагхеид и сар, 2006). Елзагхеид и сар. су доказали да је експресија Е-кадхерина (CI) у примарним туморима била значајно већа код пацијената са рецидивом у односу на оне без рецидива током њиховог праћења, док је била нижа код оних који нису имали примарне метастазе и нису развили рецидиве болести током времена, што сугерише да аберантна експресија Е-кадхерина (CI) одражава неповољно биолошко понашање CRC (Елзагхеид и сар, 2006). Ова дисертација је такође показала да је у групи MAC виша аберантна експресија Е-кадхерина (CI) повезана са вишим стадијумом туморске болести, што је такође у складу са литературним подацима (Елзагхеид и сар, 2006).

У овој студији одређивано је присуство варијанти у генима *KRAS* и *BRAF* код ЕО-CRC са муцинозним фенотипом и уочено је присуство ниске варијабилности, с обзиром да је детектовано само 5 варијанти *KRAS* гена код 8 пацијената. Молекуларне карактеристике MAC показују већу учесталост MSI, *BRAF* и *KRAS* мутација, као и CIMP-H фенотип, али мању учесталост мутација гена *TP53* (Луо и сар, 2019). *KRAS* мутације јављају се у око 40% спорадичних CRC и најчешће су у кодонима 12 и 13 (Млквá, 2016). Студије показују да се код спорадичних форми ЕО-CRC мутације *KRAS* гена јављају у око 32%-42,5% случајева (Хамилтон и сар, 2023), што сугерише да је преваленца ових мутација код ЕО-CRC нешто нижа, али у великој мери слична као код CRC који се касно испољавају (Хамилтон и сар, 2023). *BRAF* мутације се јављају у приближно 8% свих CRC, од којих је најчешћа V600E тачкаста мутација, међутим, преваленца мутација *BRAF* гена у спорадичним ЕО-CRC је значајно нижа и износи свега 1% (Хамилтон и сар, 2023), што може објаснити одсуство мутација у овом региону *BRAF* гена у испитиваној кохорти.

Раније студије су показале снажну позитивну корелацију између експресије AKR1B1 и мезенхималног маркера Виментина, као и значајну негативну корелацију између AKR1B1 и епителног маркера Е-кадхерина, што говори у прилог томе да је повећана експресија овог ензима повезана са мезенхималним фенотипом (Демиркол и сар, 2020). Резултати ове дисертације су пак показали да није било разлике у експресији Е-кадхерина (MI и CI) и Виментина у односу на AKR1B1-позитивне и AKR1B1-негативне туморе, без обзира на хистолошки тип. Сprovedено је неколико студија које су се бавиле експресијом AKR1B1 код CRC, али је ово прва студија рађена на муцинозном подтипу. Ова дисертација је прва процењивала статус AKR1B1 у односу на муцинозну хистологију, али није уочена разлика у односу на конвенционални AC, односно, хистолошки тип тумора није утицао на експресију овог ензима. Што се тиче OS у групама епителних и мезенхималних тумора, преживљавање је било дуже код пацијената са појачаном експресијом AKR1B1 у односу на пацијенте код којих је експресија овог ензима била негативна. Утицај високе експресије AKR1B1 код CRC повезан је са повећаном пролиферацијом и покретљивошћу карциномских ћелија, односно присутна је директна корелација између експресије AKR1B1 и ЕМТ фенотипа (Кахајами, и сар, 2020). Истраживања уз помоћ *in silico* метода рађена у циљу утврђивања повезаности између експресије AKR1B1 и ЕМТ показала су снажну позитивну корелацију између експресије AKR1B1 и мезенхимских маркера Виментина, ZEB1, ZEB2, TWIST1 и TWIST2, као и значајну негативну корелацију између AKR1B1 и епителног маркера Е-кадхерина, што говори у прилог томе да је повећана експресија овог ензима повезана са мезенхималним фенотипом (Демиркол и сар, 2020).

Е) Објављени радови који чине део докторске дисертације

1. **Djikić Rom A, Dragicević S, Janković R, Radojević Skodrić S, Sabljak P, Marković V, Rosić Stojković J, Barišić G, Nikolić A. Markers of Epithelial–Mesenchymal Transition and Mucinous Histology Are Significant Predictors of Disease Severity**

and Tumor Characteristics in Early-Onset Colorectal Cancer. *Diagnostics* 2024; 14(14):1512. (doi: 10.3390/diagnostics14141512) (M22, IF 3,6)

2. **Đikić Rom A, Barišić G. Histopatološke i molekularne karakteristike kolorektalnog karcinoma – osvrt na značaj epitelno-mezenhimalne tranzicije.** *MedPodml* 2024; 75(4) (doi: 10.5937/mp75-45064) (M53)

Ф) Закључак (образложење научног доприноса)

Докторска дисертација кандидаткиње др Александре Ђикић Ром, под насловом „Маркери епително-мезенхималне транзиције у муцинозном колоректалном карциному“ представља оригиналан и савремен научни рад. Резултати овог истраживања доприносе расветљавању улоге процеса епително-мезенхималне транзиције у муцинозном колоректалном карциному, као и код пацијената са раним испољавањем колоректалног карцинома. Резултати ове докторске дисертације показују да муцинозни ЕО-CRC имају значајно већу аберантну експресију цитоплазматског Е-кадхерина, као и значајно слабију диферентованост тумора и виши стадијум туморске болести у поређењу са немучинозним туморима, што наглашава важност хетеротопске експресије Е-кадхерина на степен прогресије болести. Такође, ова студија говори у прилог повезаности високе експресије Е-кадхерина и ниске вредности Виментина као позитивних предиктивних фактора код ЕО-CRC. Процес ЕМТ био је израженији код млађих пацијената са ЕО-CRC, без обзира на муцинозну хистологију, што указује да ЕМТ статус, а нарочито експресија Е-кадхерина (С1), могу представљати корисне алате за стратификацију пацијената и избор терапије код ЕО-CRC. Ова студија је прва указала на поједине специфичности у статусу ЕМТ маркера код пацијената са ЕО-CRC.

Ова докторска дисертација је урађена у складу са свим принципима научног истраживања. Циљеви су били прецизно дефинисани, научни приступ је био оригиналан и пажљиво изабран, а методологија рада је била савремена. Резултати су прегледно и систематично приказани и дискутовани, а из њих су изведени одговарајући закључци.

На основу свега наведеног, и имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, комисија предлаже Научном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду да прихвати докторску дисертацију др Александре Ђикић Ром и одобри њену јавну одбрану ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

У Београду, 20. 11. 2024.

Чланови Комисије:

Проф. др Велимир Марковић

Проф. др Радмила Јанковић

др Сандра Драгичевић,
виши научни сарадник

др Јована Росић Стојковић,
научни сарадник

Проф. др Миљан Крстић

Ментор:

Проф. др Горан Баришић

Коментор:

др Александра Николић,
научни саветник
