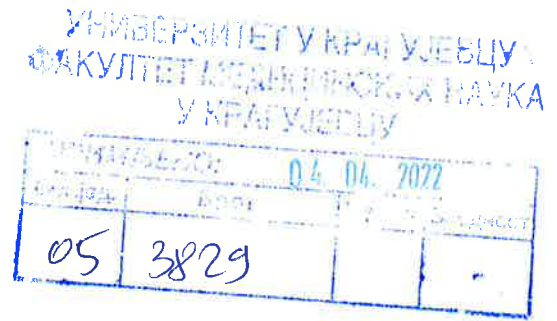


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-57/23 од 04.02.2022. године именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Јелене Радојичић, под називом:

„Повезаност експресије Лиганда 1 Програмиране Смрти (PD-L1) и сигналних путева PTEN/PI3K/Akt и Ras/Raf/MEK/ERK у ћелијама немикроцелуларног карцинома плућа“

Чланови комисије су:

1. Проф. др Иван Чекеревац, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник
2. Проф. др Милица Мијовић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици за ужу научну област Патолошка анатомија, члан
3. Др Данијела Цветковић, научни сарадник Универзитета у Крагујевцу, Институт за информационе технологије, Департман за природно-математичке науке, за ужу научну област Биологија, члан

2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Кандидат др Јелена Радојичић је рођена 23.7.1974. у Београду где је завршила основну школу, гимназију, студије медицине, обавила приправнички стаж и положила стручни испит. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписала је 2007/08 године, изборно подручје Онкологија. Усмени докторски испит положила је 18.06.2021 године. Као клинички лекар радила је у Институту за плућне болести КЦС на одељењу патологије од 2003 (до 2008) године. 2011 се запослила у Градском заводу за ургентну медицину у Београду, где и данас ради као лекар специјалиста ургентне медицине.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: Повезаност експресије Лиганда 1 Програмиране Смрти (PD-L1) и сигналних путева PTEN/PI3K/Akt и Ras/Raf/MEK/ERK у ћелијама немикроцелуларног карцинома плућа

Предмет: Анализа повезаности експресије Лиганда 1 Програмиране Смрти са генима у сигналним путевима PTEN/PI3K/Akt и Ras/Raf/MEK/ERK у ћелијама немикроцелуларног

карцинома код пацијената који су примали или нису неoadјувантну хемиотерапију. Код ове две групе пацијената испитиваће се корелација експресије PD-L1 са патолошким карактеристикама испитиваних карцинома, са дужином преживљавања оболелих и њиховим демографским подацима.

Хипотезе:

1. PD-L1 је експримиран на површини малигне ћелије испитиваних узорака NSCLC и у стромалним лимфоцитима у околини тумора.

2. Процент присуства експресије PD-L1 у малигним ћелијама NSCLC на својој површини је повезан са патолошким карактеристикама испитиваних NSCLC, дужином преживљавања и представља прогностички фактор.

3. Процент присуства експресије PD-L1 у малигним ћелијама NSCLC на површини малигних ћелија је повезан са променама у генима унутар PTEN/P13K/Akt и Ras/Raf/MEK/ERK сигналних путева и са дужином преживљавања, и тако удружени постају значајна предиктивна платформа наведених биомаркера за примену у персонализованој терапији.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат др Јелена Радојичић је публиковала рад у часопису категорије M51, који се објављује на једном од водећих светских језика, у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске дисертације:

Radojičić J, Marković J, Garabinović Ž, Savić M, Stojić J. Bilateral Changes in the Lungs of a Pregnant Woman Caused By Bilateral Spontaneous Pneumothorax. Ser J Exp Clin Res. 2020; doi: 10.2478/sjecr-2020-0027. M51

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Карцином плућа је малигни тумор са највећом стопом морталитета у свету и код нас. Неситноћелијски тип карцинома плућа се дијагностикује код око 80% оболелих, а у време дијагностиковања код већине оболелих, око 80%, овај тип карцинома је у узнапредовалом, неоперабилном стадијуму болести. Осим генске или молекулске терапије у последњих неколико година се примењује и имунотерапија код пацијената са иноперабилним NSCLC код којих је утврђено да се може очекивати повољан одговор на терапију. Кандидати за имунотерапију се одређују семиквантитативном методом анализе присуства експресије PD-L1 на мембрани малигних ћелија NSCLC. Уколико је експресија PD-L1 присутна на 50% и више малигних ћелија NSCLC на анализираном пресеку, пацијент је кандидат за примену имунотерапије уз услов да је карцином у неоперабилном стадијуму болести. Велики број радова се бави истраживањима генске, односно молекулске терапије, поготово оних повезаних са Ras/Raf/MEK/ERK и PTEN/P13K/Akt сигналним путевима трансдукције сигнала са мембранских и цитоплазматских сензора до транскриптивних фактора који улазе у једру и регулишу експресију гена али је мало истраживања која повезују ниво експресије PD-L1 на површини малигних ћелија карцинома плућа са могућим променама гена у наведеним сигналним путевима.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај ове студије се огледа у томе што би се могло установити постојање повезаности између генских промена у два поменута сигнална пута и експресије PD-L1, а што би довело до примене комбиноване генске и имунотерапије која би заједнички утицала на апоптозу малигну хелија, нарочито код NSCLC са умереном експресијом PD-L1. Овај вид терапије би утицао на продужење преживљавања и побољшање квалитета живота оболелих од узнапредовалог NSCLC. Овако комбинована терапија би могла постати нови модалитет у персонализованој терапији узнапредовалог NSCLC, пошто постоје студије које већ разматрају примену комбиноване хемиотерапије код NSCLC са умереном експресијом PD-L1.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Постоје радови који истражују генску, односно молекулску терапију, поготово они везани за испитивање PTEN/P13K/Akt и Ras/Raf/MEK/ERK сигналних путева који полазе од површине хелије до транскриптивних фактора регулишући експресију гена у једру. У развијеним земљама примењују се неки од лекова заснованих на инактивацији Ras, Raf, PTEN, Akt и MEK/ERK гена.

Имунотерапија се у савременој онкологији осим код NSCLC примењује код уротелних, гастричних и колоректалних карцинома и карцинома дојке. Инхибитори PD-1 и PD-L1 се користе као имунотерапијски лекови. То су инхибитори контролних тачака хелијског циклуса. PD-L1 (енгл*. *Programmed death ligand*) је присутан на површини малигне хелије, а PD-1 на површини активираних лимфоцита.

У последње време применом имунотерапије моноклонским антителима анти PD-L1 у терапији узнапредовалог NSCLC добијени су добри резултати у нашој популацији. Генска или молекуларна терапија такође даје добре резултате применом EGFR и ALK - TKI инхибитора рецептора на површини малигну хелија NSCLC, а који се налазе на почетку два анализирана сигнална пута. У мањем броју случајева узнапредовалог NSCLC, откривене су курабилне генске мутације и у два испитивана сигнална пута, PTEN/P13K/Akt и Ras/Raf/MEK/ERK.

Литературни подаци су ретки, а намера ове студије је да установи могуће постојање повезаности између генских промена у два сигнална пута и експресије PD-L1, као и могућност примене комбиноване, генске и имунотерапије, што би утицало на квалитетније продужење преживљавања оболелих од узнапредовалог NSCLC.

2.7. Методе истраживања

2.7.1 Врста студије

Тип студије који ће се користити је клиничко-експериментална студија. Етички Одбор Универзитетског Клиничког центра Србије је издао сагласност под бројем 175/2 од 27.4.2021. за коришћење података за израду докторске тезе.

2.7.2. Популација која се истражује

Испитиваће се две групе по 35 пацијената хируршки лечених пацијената, укупно 70, оба пола, различите животне доби, од којих је једна пре операције примила индукциону хемиотерапију, а друга група је оперисана без претходне примене хемиотерапије.

2.7.3. Узорковање

Узорковање ће се обавити одабиром оболелих којима је на Одељењу торакопулмоналне патологије, Службе за патохистологију Универзитетског Клиничког центра Србије постоперативно постављена патохистолошка дијагноза NSCLC.

Од патохистолошких варијабли осим хистолошког типа, аденокарцинома и сквамозелуларног карцинома, укључићемо и хистолошки градус – степен хистолошке диференцијације карцинома (1-3), стадијум туморске болести (T1-T4), ширење у регионалне лимфне чворове (N0-N2), што ће одредити патолошки стадијум туморске болести pTNM, а из овог податка ће се одредити и клинички стадијум туморске болести cTNM (I-IV).

Добијени резултати ће се поредити и са дезмопластичном - везивноткивном и присуством стромалних ћелија запаљења, углавном лимфоцита у строми карцинома. Користиће се тренутно важећа класификација патохистолошког стадијума туморске болести (pTNM).

Узорци ткива карцинома плућа добијени оперативним путем су фиксирани у 10 % неутралном пуферисаном раствору формалина, у току 24 h, а затим дехидрирани кроз растуће концентрације алкохола (70 %, 96 % и 100 %), па фиксирани у ксилолу. Након тога парафином су прожимани и дехидрирани, а затим калупљени у парафинске блокове, из којих се ткиво карцинома секло на дебљину 4 μ m, ротационим микротомом. Депарафинизација узорака се врши у ксилолу а затим њихова дехидратација у опадајућој концентрацији алкохола. Исечци се боје Мајеровим хематоксилином, а по просветљавању ксилолом у 2% раствору еозина. На крају се препарати прекривају покровним плочицама.

Имунохистохемијска бојења ће бити изведена на пресецима анализираних исечака NSCLC према протоколу произвођача антитела.

Испитивања ће се вршити на туморском ткиву и околном нетуморском ткиву истог калупа. Нетуморско ткиво ће се користити као негативна контрола, а позитивна контрола ће се користити по препоруци произвођача антитела.

Пре започињања бојења вршићемо на контролним пресецима одређивање адекватног разблажења антитела и потврдити њихову експресију у карактеристичном органу или органели ћелија органа по препоруци произвођача – “позитивна контрола”.

Процедура имунохистохемијског бојења подразумева поступке демаскирања антигена, блокирања ендogene пероксидазе, инкубирања препарата са примарним антисерумом и поступак извођења имунохистохемијске методе - LSAB+.

Као општи растварач антисерума и средство за испирање између различитих корака у току имунохистохемијске процедуре бојења користиће се физиолошки раствор пуферизован фосфатом (PBS фосфатни пуфер pH 7.4).

Пропорција присуства експресије PD-L1 ће бити евалуирана само у малигним ћелијама примарног NSCLC. Користићемо клон PD-L1 22C3 pharmDx, прозвођач ДАКО, Глоструп, Данска. Поштоваће се протокол на ДАКО платформи по аутоматски контролисаној процедури у Аутостејнеру ЛИНК48. Одређиваће се „*Tumor proportion score*“ – TPS, који се дефинише као проценат малигних ћелија у ћелијама NSCLC у односу на њихов укупан број на пресеку. Адекватан узорак за евалуацију, односно пресек, ће се сматрати онај који има више од 100 малигних ћелија на пресеку. Зато ће за PD-L1 и остале анализе најподеснији пресеци NSCLC бити они добијени хируршком интервенцијом. Патолози ће евалуирати све узорке на више увеличања 10×, 20×, 40×.

Према овом резултату нивоа TPS експресије се дели на 3 подгрупе:

- Без експресије, TPS: < 1 % , од укупног броја анализираних малигних ћелија,
- Умерена експресија, TPS: 1-49 % , од укупног броја анализираних малигних ћелија,
- Висока експресија, TPS: ≥ 50 %.

„Позитивна контрола“ ће бити ткиво тонзиле или синциотиотрофобластне ћелије.

Уколико би на анализираном пресеку 50 % и више процената малигних ћелије експримирали PD-L1 на својој површини, сматрало би се да је пацијент кандидат за лечење имунотерапијом, уколико је у задовољавајућем општем стању. Очекује се да ће проценат ћелија које експримирају PD-L1 бити повезан са одговором тумора на имунотерапију.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле:

Експресија PD-L1, демографске карактеристике болесника, хистолошки тип тумора, хистолошки градус тумора, стадијум туморске болести примарног тумора, местастазе у регионалним лимфним чворовима, клинички стадијум туморске болести, дезмопластична реакција, некроза, лимфоцитни инфилтрат у строми тумора, лимфоваскуларна инвазија, перинеурална инвазија тумора

Зависне варијабле: експресија PTEN, експресија pAkt, експресија pERK

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Снага студије и величина узорка израчуната је на основу података о нивоу експресије PD-L1 на ћелијама NSCLC публикованих у ретким студијама сличног дизајна. Добијена је потребна величина узорка од 69 пацијената да би се добио двострани 95% интервал поверења са прецизношћу 10%, а када је очекивани проценат високе експресије 23% (5, 12).

2.7.6. Статистичка анализа

У овој студији ће бити коришћене дескриптивне и аналитичке статистичке методе. Дескриптивне методе: апсолутни и релативни бројеви (n, %), мере централне тенденције (аритметичка средина, медијана) и мере дисперзије (стандардна девијација, стандардна грешка, перцентили). Од аналитичких метода у статистици ће се користити тестови разлике анализе повезаности. Парамететарски тестови разлике су: t тест, АНОВАА и непараметарски (Ни-квadrat тест, Mann-Whitney U тест, Kruskal-Wallis тест).

За анализу повезаности користиће се Пирсонова или Спирманова корелација. За евалуацију маркера у смислу прогнозе исхода користиће се Кокс регресиона анализа. Користиће се и Каплан-Мајерова крива са Лог-ранк тестом. Резултати и табеле ће се такође примењивати. Ниво значајности односно вероватноћа грешке износиће 0.05. Подаци су били у SPSS 20.0 (ИБМ корпорација) софтверском пакету.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекујемо да ће се наћи повезаност између експресије PD-L1 у ћелијама NSCLC са експресијом протеина кодираних генима анализираних сигналних путева, PTEN/P13K/Akt и Ras/Raf/MEK/ERK. Нарочито је занимљиво очекивати повезаност умерене експресије PD-L1 у ћелијама NSCLC са експресијом протеина кодираних генима наведених сигналних путева. Овим радом би се могло утврдити да би се уз имунотерапију могла применити и генска терапија јер би се очекивао бољи одговор карцинома плућа као и дуже преживљавање пацијената.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Предмет истраживања ове студије ће бити утврђивање корелације нивоа експресије PD-L1 и промена у генима сигналних путева задужених за апоптозу у ћелијама NSCLC. Истраживање ће бити спроведено као клиничко-експериментална студија која ће обухватити патохистолошки материјал након хируршке ресекције тумора. Од 70 испитаника, 35 је претходно било подвргнуто неoadјувантној терапији а 35 није. Овај материјал ће бити анализиран имунохистохемијски ради утврђивања нивоа експресије PD-L1 и експресије протеина кодираних генима сигналних путева, PTEN/P13K/Akt и Ras/Raf/MEK/ERK. Код ове две групе пацијената испитиваће се корелација експресије PD-L1 са патолошким карактеристикама испитиваних карцинома, са дужином преживљавања оболелих и њиховим демографским карактеристикама. Статистичка обрада података ће се вршити дескриптивним и аналитичким методама.

Циљ ове студије је могуће изналажење нових, индивидуалних модалитета лечења узнапредовалог облика NSCLC.

3. Предлог ментора

Комисија за ментора ове докторске дисертације предлаже ВНС др Јелену Стојшић, вишег научног сарадника Факултета медицинских Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка анатомија.

ВНС др Јелена Стојшић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9 за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

1. Milosevic Z, Pesic M, Stankovic T, Dinic J, Milovanovic Z, **Stojsic J**, Dzodic R, Tanic N, Bankovic J. Targeting RAS-MAPK-ERK and PI3K-AKT-mTOR signal transduction pathways to chemosensitize anaplastic thyroid carcinoma. *Transl Res.* 2014;164(5):411-23.

2. **Stojsic J**, Stankovic T, Stojkovic S, Milinkovic V, Dinic J, Milosevic Z; Milovanovic Z, Tanic N, Bankovic J. Prolonged survival after neoadjuvant chemotherapy related with specific molecular alterations in the patients with nonsmall-cell lung carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2015; 98: 27–32.

3. Stankovic T, **Stojsic J**, Dragoj M, Milovanovic Z, Milosevic Z, Milinkovic V, Skodric-Trifunovic V, Denic-Markovic Lj, Pesic M, Stojkovic Buric S, Tanic N, Bankovic J. Chemosensitivity and survival of non-small cell lung carcinoma patients receiving neoadjuvant therapy depend on the expression of multidrug efflux transporters. *J Mol Clin Med* 2019; 2 (4): 129-35.

4. Alcala N, Leblay N, Gabriel AAG, Mangiante L, Hervas D, Giffon T, Sertier AS, Ferrari A, Derks J, Ghantous A, Delhomme TM, Chabrier A, Cuenin C, Abedi-Ardekani B, Boland A, Olasso R, Meyer V, Altmuller J, Le Calvez-Kelm F, Durand G, Voegelé C, Boyault S, Moonen L, Lemaitre N, Lorimier P, Toffart AC, Soltermann A, Clement JH, Saenger J, Field JK, Brevet M, Blanc-Fournier C, Galateau-Salle F, Le Stang N, Russell PA, Wright G, Sozzi G, Pastorino U, Lacomme S, Vignaud JM, Hofman V, Hofman P, Brustugun OT, Lund-Iversen M, Thomas de Montpreville V, Muscarella LA, Graziano P, Popper H, **Stojsic J**, Deleuze JF, Herceg Z, Viari A, Nuernberg P, Pelosi G, Dingemans AMC, Milione M, Roz L, Brcic L, Volante M, Papotti MG, Caux C, Sandoval J, Hernandez-Vargas H, Brambilla E, Speel EJM, Girard N, Lantuejoul S, McKay JD, Foll M, Fernandez-Cuesta L. Integrative and comparative genomic analyses identify clinically relevant groups of pulmonary carcinoids and unveil supra-carcinoids. *Nat Commun.* 2019; 10(1): 3407.

5. Velinovic M, Jankovic R, Jovanovic D, Skodric Trifunovic V, Gavrilovic D, **Stojisic J**, Cavic M. Tumor characteristics, expressions of ERCC1, Bax, p53, IGF1R, Bcl2, Bcl2/Bax and prognostic factors for overall survival in patients with lung carcinoid. J BUON 2019; 24(1): 256-66.

6. Liu Y, Xia J, McKay J, Tsavachidis S, Xiao X, Spitz MR, Cheng C, Byun J, Hong W, Li Y, Zhu D, Song Z, Rosenberg SM, Scheurer ME, Kheradmand F, Pikielny CW, Lusk CM, Schwartz AG, Wistuba II, Cho MH, Silverman EK, Bailey-Wilson J, Pinney SM, Anderson M, Kupert E, Gaba C, Mandal D, You M, de Andrade M, Yang P, Liloglou T, Davies MPA, Lissowska J, Swiatkowska B, Zaridze D, Mukeria A, Janout V, Holcatova I, Mates D, **Stojisic J**, Scelo G, Brennan P, Liu G, Field JK, Hung RJ, Christiani DC, Amos CI. Rare deleterious germline variants and risk of lung cancer. NPJ Precis Oncol. 2021; 5(1): 12.

4. Научна област дисертације

Медицина. Онкологија

5. Научна област чланова комисије

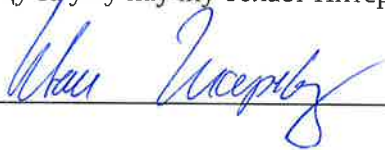
1. Проф. др Иван Чекеревац, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник
2. Проф. др Милица Мијовић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици за ужу научну област Патолошка анатомија, члан
3. Др Данијела Цветковић, научни сарадник Универзитета у Крагујевцу, Институт за информационе технологије, Департман за природно-математичке науке, за ужу научну област Биологија, члан

Закључак и предлог комисије:

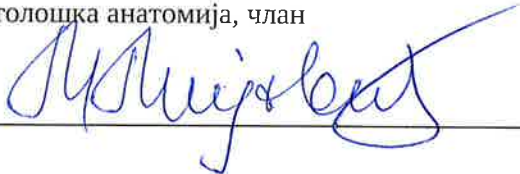
На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Јелене Радојичић, Комисија закључује да кандидат испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Јелене Радојичић, под називом „Повезаност експресије Лиганда 1 Програмиране Смрти (PD-L1) и сигналних путева РТЕН/РІЗК/Акт и Ras/Raf/МЕК/ЕРК у ћелијама немикроцелуларног карцинома плућа “ и одобри њену израду.

1. Проф. др Иван Чекеревац, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник



2. Проф. др Милица Мијовић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици за ужу научну област Патолошка анатомија, члан



3. Др Данијела Цветковић, научни сарадник Универзитета у Крагујевцу, Институт за информационе технологије, Департман за природно-математичке науке, за ужу научну област Биологија, члан

