

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА
ВОЈНОМЕДИЦИНСКЕ АКАДЕМИЈЕ УНИВЕРЗИТЕТА ОДБРАНЕ У БЕОГРАДУ

Одлуком број 63/90 на 90. конститутивној седници Наставно-научног већа Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране која је одржана 30.09.2021. формирана је комисија за оцену завршене докторске дисертације под насловом:

„Значај детекције генетичког реаранжмана *EWSR1* и нивоа експресије PD-L1 протеина као прогностичких биомаркера у папиларном микрокарциному штитасте жлезде»,

кандидата потпуковника асистента др Божидара Ковачевића из Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије у Београду.

Ментор. Ве доц. др Весна Шкулетић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета Одбране у Београду.

За оцену завршене докторске дисертације именована је комисија у саставу:

1. ВС проф. др Снежана Церовић – Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета Одбране у Београду- председник (ужа научна област патологија);
2. проф. др Светислав Татић- Медицински факултет Универзитета у Београду- члан (ужа научна област патологија);
3. ВС научни саветник, проф. др Драгана Вучевић- Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета Одбране у Београду-члан (ужа научна област имунологија).

Након анализе приложене докторске дисертације комисија једногласно доставља следећи извештај Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета Одбране у Београду:

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Према својој структури, рад садржи све елементе докторске дисертације. Докторска дисертација написана је на 120 страна и подељена на следећа поглавља: увод (18 страна), хипотеза и циљеви истраживања (2 стране), материјал и методе (7 страна), резултати (50 страна), дискусија (18 страна), закључак (1 страна), литература (18 страна). У уводу се налази 10 фотографија. Резултати су документовани кроз 15 табела, 41 графикон и са 21 фотографијом. У литератури су цитирани подаци изведени из 196 референци.

Приложена докторска дисертација односи се на утврђивање биолошке агресивности папиларног микрокарцинома штитасте жлезде (енг. papillary thyroid microcarcinoma, m-PTC) у оквиру морфолошких и одређених молекуларних и имулошких параметара. Досадашња сазнања у уводу дисертације показују да је папиларни микрокарцином штитасте жлезде најчешћа варијанта папиларног карцинома штитасте жлезде (papillary thyroid carcinoma, PTC) посебно код болесника старијих од 45 година. Светска здравствена организација m-PTC дефинише као карцином штитасте жлезде са највећим пречником до 10 мм. Прикупљени подаци о раној и/или инциденталној детекцији промена у малим нодусима штитасте жлезде указују на стални пораст учесталости m-PTC. Код више од 90% болесника m-PTC показује изузетно повољно биолошко понашање, без знакова рецидива и метастаза у периоду од 10-20 година након хируршког одстрањивања ШЖ, са смртним исходом испод 1%. Међутим, као m-PTC могу да се морфолошки презентују и неке биолошки агресивније варијанте као што су: солидна, варијанта високих и варијанта цилиндричних ћелија. Најчешћа форма туморског раста m-PTC је инфилтративна, ређе ограничена/експанзивна или инкапсулирана, а морфолошки се најчешће ради о класичној папиларној и/или фоликуларној варијанти. Примарно, m-PTC може бити локализован у периферним/субкапсуларним или централним/интрапаренхимским зонама свих анатомских делова ШЖ. Стандардни клиничко-патолошки фактори који се повезују са потенцијално агресивнијим понашањем m-PTC су: старост болесника (<45 год.), мушки пол, присуство метастаза у време операције, мултифокалност, екстратиреоидно ширење, лимфоваскуларна инвазија, величина тумора, периферна/субкапсуларна локализација и одсуство Хашимотовог тиреоидитиса. Присуство метастаза у регионалним лимфним чворовима значајно је удружено и са инфилтративним растом тумора, високоћелијском морфологијом, дезмопластичном стромалном реакцијом и густином перитуморских лимфатика. Повезивање стандардних и бројних молекулских параметара омогућује разликовање m-PTC различитог малигног потенцијала и од великог је значаја у процени опсежности хируршког захвата и постоперативног лечења. У последње две деценије учињен је значајан напредак у разумевању повезаности генетичких измена, биолошког понашања и клиничко-патолошких карактеристика m-PTC. Најчешће детектоване генетичке измене у m-PTC доводе до активације пута преноса сигнала MAP киназе. Молекуларне измене сигналног пута MAP киназе региструју се у различитим фазама неопластичне трансформације m-PTC и то најчешће као генетички реаранжмани *RET-PTC*, или тачкасте мутације у генима *BRAF* и *RAS*. Тачкасте мутације су присутне у сва три гена који кодирају протеине RAS. Посебан значај има најчешћа тачкаста мутација V600E у гену *BRAF*, заступљена код око 57% болесника за коју је показано да је повезана са подтиповима m-PTC агресивнијег понашања. Међутим, индивидуалне морфолошке, клиничке или молекуларне карактеристике m-PTC још увек не представљају независни прогностички параметар у селекцији болесника са потенцијално агресивним формама тумора. Резултати малог броја студија у последњих неколико година показали су да присуство мутације у гену *TERT* у PTC представља неповољан прогностички параметар. Докторска дисертација потпуковника асистента др Божидара Ковачевића, у време писања извештаја о завршеној докторској дисертацији, тек је друга у свету везана за значај детекције реаранжмана гена Јуинг саркома региона 1

(енг. Ewing sarcoma breakpoint region 1, - *EWSR1*.) у m-PTC. Новија истраживања о значају реаранжмана гена Јуинг саркома региона 1 изучавају се у онкогенези различитих типова неоплазми. Ген *EWSR1* кодира мултифункционални протеин EWS (енг. Ewing sarkoma protein, - EWS) који своју биолошку улогу испољава у процесима регулације експресије гена на нивоу иницијације транскрипције, на нивоу путева преноса сигнала и транспорта iRNK. Поред улоге у регулацији експресије, показана је и његова улога у процесима одговорним за очување интегритета генома. Хромозомске транслокације између овог и других гена који кодирају регулаторне протеине транскрипције доводе до експресије фузионисаних протеина са онкогеним потенцијалном који је одговоран за неопластичну трансформацију ћелија. Поред Јуинг-ове фамилије тумора *EWSR1* реаранжмани су детектовани и у великом броју мезенхимних и епителних неоплазми. У току 2017. г први пут су публиковани резултати студије у којој је пријављена висока заступљеност *EWSR1* генетичког реаранжмана код 51,9% PTC. Резултати ове студије нису показали позитивну корелацију присуства генетичког реаранжмана *EWSR1* са клиничко-патолошким карактеристикама тумора, али је нађена његова чешћа детекција у класичној форми PTC. Новија истраживања усмерена су и на значај активације тумором индукованих механизма имуносупресије у биолошком току добро диферентованих карцинома ШЖ. Међу идентификованим биолошким маркерима посебан значај заузима протеин PD-L1, лиганд 1 рецептора програмиране ћелијске смрти (енг. Programmed death ligand-1, PD-L1). Лиганд 1 рецептора програмиране ћелијске смрти показује способност индукције апоптозе активираних имунских ћелија везивањем за рецептор програмиране ћелијске смрти (PD-1). Способност туморских ћелија да испоље PD-L1 доводи до инхибиције Т ћелијски посредованог антитуморског имунског одговора чиме је омогућено преживљавање и прогресија тумора. Резултати студија о значају PD-L1 експресије у PTC показују да се овај молекул детектује у распону од 6% до 52,3% анализираних узорака и да је повезана са већим ризиком за појаву рецидива. Утврђена је позитивна корелација повећаног нивоа експресије PD-L1 са мултифокалним и инвазивним растом PTC, екстратиреоидним ширењем и појавом метастаза. Оригинално и научна заснованост докторске дисертације потпуковника асистента др Божидара Ковачевића налази се у резултатима корелација нивоа експресије PD-L1 и присуства генетичког реаранжмана *EWSR1* са клиничко-патолошким карактеристикама m-PTC, његовим специфичним формама и локализацијама. У доступној литератури нема радова који анализирају паралелни и прогностички значај ових параметара у m-PTC.

Према наведеним подацима др Ковачевић је поставио следећу **хипотезу**:

Присуство генетичког реаранжмана *EWSR1*, имунохистохемијска експресија PD-L1 протеина и периферна локализација m-PTC представљају предиктивне маркере који указују на чешћу појаву метастаза у регионалним лимфним чворовима оболелих.

За проверу хипотезе постављени су следећи **циљеви истраживања**:

1. Испитати присуство реаранжмана *EWSR1* у ПМКЖШ код болесника са учињеном тоталном тиреоидектомијом.
2. Испитати корелацију између присуства генетичког реаранжмана *EWSR1* у ПМКЖШ и појаве метастаза у регионалним лимфним чворовима врата оболелих.
3. Испитати корелацију између присуства генетичког реаранжмана *EWSR1* у m-PTC и клиничко-патохистолошких карактеристика тумора.
4. Испитати ниво имунохистохемијске испољености PD-L1 протеина у ПМКЖШ код болесника са учињеном тоталном тиреоидектомијом.
5. Испитати корелацију између нивоа имунохистохемијске испољености PD-L1 протеина у m-PTC са клиничко-патохистолошким карактеристикама тумора.
6. Испитати корелацију између периферне локализације m-PTC и клиничко-патохистолошких карактеристикама тумора.
7. Испитати корелацију између периферне локализације m-PTC и присуства генетичког реаранжмана *EWSR1* код болесника са или без метастаза у регионалним лимфним чворовима.
8. Испитати корелацију између периферне локализације m-PTC и нивоа испољености протеина PD-L1 код болесника са или без метастаза у регионалним лимфним чворовима.

У поглављу **испитаници и метод истраживања** др Ковачевић наводи да се ради о ретроспективној студији која је одобрена од стране етичког комитета Војномедицинске академије од 30 октобра 2018. године и Ректората Универзитета одбране, Београд, Србија (одлука број 16-71 од 25.05.2019.). Из архиве Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије у периоду од јануара 2013.г до децембра 2018.г, из хируршког материјала добијеног тоталном тиреоидектомијом са или без лимфаденектомије издвојена је група m-PTC. Код свих случајева класификација тумора је учињена према IV издању СЗО класификације тумора ШЖ и одређен је стадијум болести на основу VIII издања AJCC/TNM за стадијуме болести карцинома ШЖ. У селектованој групи болесника анализирана је заступљеност m-PTC према полу и старости, посебно кроз две старосне категорије. Прву групу чинили су испитаници млађи од 55 година старости, а другу испитаници са или више од 55 година. У студију нису укључени болесници са дијагностикованим m-PTC након учињене лобектомије, болесници са m-PTC мањим од 5 mm, болесници са тумором већим од 5 mm уколико је након рутинске и/или интраоперативне („ex tempore“) патохистолошке дијагностике дошло до значајне редукције или губитка туморског ткива у парафинским блоковима. У студију нису укључени болесници који су примали имуносупресивну терапију због њеног потенцијалног утицаја на тумачење нивоа експресије PD-L1 молекула. Након селекције истраживање је спроведено код 99 болесника са m-PTC. Од патохистолошких параметара детаљно су анализирани: величина и локализација

тумора (периферна или интрапаренхимска); форма раста и хистолошка варијаната m-PTC; мултифокалност/интрагландуларно ширење m-PTC, инвазија лимфатика и васкуларна инвазија, екстратиреоидно ширење, присуство псамозних тела, стромални калцификати, интратуморска фиброза, интратумурски лимфоидни инфилтрати/тумор инфилтришући лимфоцити (ТИЛ), Хашимотов/лимфоцитни тиреоидитис и присуство метастаза у лимфним чворовима врата. Детекција *EWSR1*-реаранжмана урађена је методом флуоресцентне *in situ* хибридизације (енг. *FISH*) у Институту за имунологију и молекуларну патологију („IPATIMUP“), Медицинског факултета, Универзитета у Порту, Португалија. Анализирани су узорци ткива m-PTC у чијој су дијагностици учествовала два патолога без увида у клиничко-патолошке карактеристике тумора. За сваки анализирани пресек ткива са тумором анализирано је 50 нуклеуса на присуство *EWSR1*-реаранжмана, *EWSR1*-моносомије, *EWSR1*-полисомије и *EWSR1-FLII* фузије. *EWSR1*-реаранжман је присутан у једру уколико је уочен сигнал сепарације на 5'-наранџастом и 3'-зеленом делу *EWSR1* пробе. Уколико је сигнал сепарације присутан заједно са фузијом 5'-наранџастиг сигнала *EWSR1* гена и плавог сигнала *FLII* гена, нуклеус је одређен као позитиван на присуство *EWSR1-FLII* фузије, односно транслокације. За имунохистохемијску анализу нивоа експресије протеина PD-L1 примењено је моноклонско, мишије, анти хумано анти PD-L1 антитело (у разблажењу 1:50) а као систем за визуелизацију EnVision FLEX+, Mouse, High pH, RP, Mouse. Имунохистохемијска реакција за PD-L1 вреднована је према интензитету обојености туморских ћелија семиквантитативно као: 0-негативна реакција, 1+ слаба реакција, 2+ умерена реакција и 3+ интензивна реакција. Према проценту позитивних туморских ћелија резултати су вредновани кроз пет група. Резултати су приказани параметрима дескриптивне статистике, као мере централне тенденције - аритметичка средина (X) и медијана (med), мере варијабилитета - интервал варијације ($max-min$), стандардна девијација (SD) или као апсолутни и релативни бројеви. За утврђивање значајности квалитативних варијабила примењени су *Pearson*-ов *chi square* (χ^2) тест и/или *Fisher*-ов егзактни тест. За упоређивање квантитативних варијабила коришћени су *Student*-ов *t* тест, *Mann-Whitney* тест и *Pearson*-ов тест корелације. Разлике су одређене као статистички значајне уколико је p мањи од 0,05. Сви статистички прорачуни добијени су коришћењем софтвера *SPSS*.

У поглављу **резултати** др Ковачевић детаљно обрађује податке и јасно представља резултате у свему одређене задатим циљевима истраживања.

Дискусија је јасна, прегледна, циљано и објективно прилагођена савременој литератури кроз компарацију публикованих и оригиналних резултата.

Закључци показују потврду хипотезе и најзначајније резултата докторске дисертације.

Литература обухвата 196 референце.

Б) Кратак опис постигнутих резултата-закључци

Добијени резултати показују:

1. Присуство генетичког реаранжмана *EWSR1*, имунохистохемијска експресија PD-L1 протеина и периферна локализација m-PTC представљају предиктивне маркере који указују на чешћу појаву метастаза у регионалним лимфним чворовима оболелих.
2. Реаранжмани *EWSR1* гена једна су од најчешћих генетичких измена у m-PTC јер се детектују у више од 90% тумора.
3. Присуство генетичког реаранжмана *EWSR1* у m-PTC у позитивној је корелацији са класичном морфолошком формом и присуством ситноћелијског фенотипа, али не и са локализацијом тумора и појавом метастаза у регионалним лимфним чворовима врата.
4. Експресија PD-L1 протеина детектује се код више од 61% болесника са m-PTC и показује високу статистичку значајност у односу на појаву метастаза у регионалним лимфним чворовима врата.
5. Анализирана кроз локализацију тумора, експресија PD-L1 протеина статистички је значајно чешћа у периферним/субкапсуларним m-PTC у односу на интрапаренхимске m-PTC.
6. Периферна локализација m-PTC представља независан клиничко-патолошки параметар повезан са чешћим метастазирањем m-PTC у ЛЧ врата.
7. Периферно локализовани m-PTC морфолошки су различити од интрапаренхимских m-PTC због статистички значајне заступљености параметара као што су: класична морфолошка форма, инфилтративни раст, инвазија лимфатика и крвних судова, микроскопско и макроскопско ЕТШ.

В) Упоредна анализа резултата докторске дисертације са резултатима из литературе

У поглављу дискусија др Ковачевић је дао детаљни и критички увид у резултате своје дисертације, све време анализирајући постојеће литературне резултате везане за параметре агресивности m-PTC. Резултати ове докторске дисертације дају велики допринос бољем разумевању функционалног значаја и улоге молекуларних измена везаним за учесталост генетичког реаранжмана *EWSR1* и нивое експресије PD-L1 протеина у m-PTC, у оквиру бржег издавајања групе тумора са агресивнијим клиничко-патолошким карактеристикама. Осим као прогностички биомаркер, позитивна корелација морфолошких карактеристика и статус молекуларних параметара (реаранжмана *EWSR1* и нивоа експресије PD-L1) у m-PTC могла би да буде значајна и у планирању обимности оперативног лечења и додатног постоперативног третмана. Резултати ове студије показали су да је и локализација

m-PTC као морфолошки параметар прогностички важна у процени агресивности ове варијанте тумора ШЖ.

Г) Објављени радови из докторске дисертације

1. **Kovacevic B**, Vucevic D, Cerovic S, Eloy C. Peripheral Versus Intraparenchymal Papillary Thyroid Microcarcinoma: Different Morphologies and PD-L1 Expression. *Head Neck Pathol.* 2021 Jun 2. doi: 10.1007/s12105-021-01337-1. Epub ahead of print. PMID: 34076845.
2. **Kovacevic B**, Caramelo A, Skuletic V, Cerovic S, Eloy C. EWSR1 rearrangement in papillary thyroid microcarcinoma is related to classic morphology and the presence of small-cell phenotype. *Bosn J Basic Med Sci.* 2021 Aug 9. doi: 10.17305/bjms.2021.6181. Epub ahead of print. PMID: 34374640.
3. **Kovačević B**, Kuzmić-Janković S, Milev B, Škuletić V. Multifocal papillary thyroid microcarcinoma in the end stage of Hashimoto's thyroiditis. *Srp Arh Celok lek.* 2018;148(11-12):672-676 DOI: <https://doi.org/10.2298/SARH171114210K>.
4. **Kovačević B**, Eloy C, Karajović J, Kuzmić-Janković S, Soldatović I, Petrović M, Cerović S. Incidence and morphological features of thyroid papillary microcarcinoma in Graves' disease. *Srp Arh Celok Lek.* 2017;145(9-10):457-462 DOI: <https://doi.org/10.2298/SARH161201092K>.

Д) Закључак

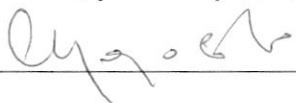
Кандидат потпуковник асистент др Божидар Ковачевић у потпуности испуњава све услове који обухватају написану докторску дисертацију и објављене радове који су из ње проистекли. Резултати истраживања публиковани су као четири научна рада, од којих један у категорији М22 (ИФ2020-3,36), два у категорији М23 (ИФ 2018-0,299) и један електронски часопис без категоризације. Докторска дисертација под насловом: „**Значај детекције генетичког реаранжмана *EWSR1* и нивоа експресије PD-L1 протеина као прогностичких биомаркера у папиларном микрокарциному штитасте жлезде**», кандидата потпуковника асистента др Божидара Ковачевића, представља оригиналан и актуелан научни рад из области молекуларне медицине. Дисертација је написана студиозно, актуелно, систематично и целовито. Добијени резултати представљају значајан и оригиналан допринос компарацији морфолошких карактеристика и молекуларних параметара (реаранжмана *EWSR1* и нивоа експресије PD-L1) у m-PTC у циљу планирања обимности оперативног лечења и додатних постоперативних терапијских модалитета.

На основу изнетог и увидом у досадашњи научни рад кандидата комисија закључује да докторска дисертација потпуковника асистента др Божидара Ковачевића испуњава све предвиђене критеријуме које захтева академска пракса и, као таква, омогућује значајни допринос проучавању у датој области. Кандидат испуњава све законом предвиђене услове за одбрану докторске дисертације. Комисија једногласно предлаже Одбору за специјалистичке и докторске студије

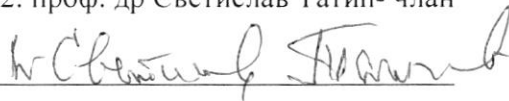
Медицинског факултета ВМА УО да извештај прихвати и предложи Научно-наставном већу Медицинског факултета ВМА УО на даље усвајање као завршену докторску дисертацију потпуковника асистента др Божидара Ковачевића и одобри јавну одбрану.

У Београду 08.10.2021.г

1. ВС проф. др Снежана Церовић –председник



2. проф. др Светислав Татић- члан



3. ВС научни саветник, проф. др Драгана Вучевић -члан





РЕПУБЛИКА СРБИЈА
МИНИСТАРСТВО ОДБРАНЕ
УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ
Медицински факултет ВМА

— Бр. 4179-1

14.10.2021. год
БЕОГРАД