

## ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

| <b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b>  |
|---|
| <p>1. Датум и орган који је именовео комисију</p> <p><b>24.01.2019. године, Наставно-научно веће Медицинског факултета Нови Сад, Универзитет у Новом Саду</b></p>   |
| <p>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <p><b>проф. др Славица Кнежевић Ушај</b>, редовни професор Медицинског факултета Нови Сад Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Патолошка анатомија; датум избора у звање: 23.09.2016.</p> <p><b>проф. др Љиљана Тадић Латиновић</b>, ванредни професор Медицинског факултета Бања Лука Универзитета у Бањој Луци за научну област Патологија; датум избора у звање: 04.05.2015.</p> <p><b>проф. др Татјана Ивковић Капицл</b>, ванредни професор Медицинског факултета Нови Сад Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Патолошка анатомија; датум избора у звање: 15.05.2017.</p> |
| <b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b>  |
| <p>1. Име, име једног родитеља, презиме:</p> <p><b>ИЛИЈА (Владимир) БАРОШ</b></p>   |
| <p>2. Датум рођења, општина, држава:</p> <p><b>12. април 1982. године, Ливно, Босна и Херцеговина</b></p>   |
| <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер стечени стручни назив</p> <p><b>Медицински факултет Бања Лука Универзитета у Бањој Луци<br/>Студије медицине - Доктор медицине 2012. године</b></p>   |

4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија

**2014. године- студијски програм Клиничка истраживања.**

5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:

6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука:

**III НАСЛОВ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

**МОЛЕКУЛАРНА И ГЕНСКА ХЕТЕРОГЕНОСТ МЕТАСТАЗА У АКСИЛАРНИМ ЛИМФНИМ ЧВОРОВИМА КОД ПАЦИЈЕНТКИЊА СА ИНВАЗИВНИМ КАРЦИНОМОМ ДОЈКЕ**

**IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Докторска дисертација је прегледно написана на укупно 80 страница. Садржи све неопходне делове научног рада у седам поглавља (увод, циљ истраживања и основне хипотезе, материјал и методе, резултате, дискусију, закључке и литературу). Приказано је 10 слика, 4 графикана и 13 табела. У литератури је цитирано 96 библиографских јединица.

У уводном делу докторске дисертације кандидат је описао комплексност проблематике којом ће се бавити у оквиру истраживања. Истиче се значај молекуларне циљане терапије која представља велики напредак у лечењу карцинома, а терапија са највише позитивних резултата је управо терапија усмерена ка рецептору хуманог епидермалног фактора раста 2 (HER2-усмерена терапија). Посебан акценат кандидат даје прецизној идентификацији HER2 хетерогености која је важан фактор у избору адекватног терапијског приступа у лечењу карцинома дојке, а у те сврхе се посебно добрим показала се нова метода идентификације HER2, тј. HER2 GPA (енгл. gene protein assay) метода која патологу омогућава истовремену процену статуса HER2 протеина и *HER2* гена на индивидуалном ћелијском нивоу.

Циљеви докторске дисертације су били да се испита да ли су постојећи критеријуми препоручени од стране ASCO/CAP довољни за дијагностиковање HER2 позитивности код пацијенткиња које показују интратуморску хетерогеност, како у примарним туморима тако и у метастазама у регионалне лимфне чворове, учесталост HER2 хетерогености у макростазама лоцираним у лимфним чворовима, те да ли постоји јасна корелација између хетерогености нађене у примарном тумору дојке и припадајућим метастазама у лимфним чворовима, тј. да ли постоје случајеви у којима HER2 негативни примарни тумори дедиференцирањем „прелазе“ у HER2 позитивне метастазе у лимфним чворовима.

Истраживање је проведено као проспективна студија и обухватила је архивирани биопсијски материјал (парафинске калупе) од 41 пацијенткиње

које су оперисане током 2014. и 2015. године због примарног карцинома дојке са макрометастазама у аксиларним лимфним чворовима. Поступак одређивања HER2 статуса HER2 GPA методом подразумевао је да се из ткива фиксираног у формалину и импрегнираног парафином (парафински ткивни блокови) формирају исечци који су били обојени коришћењем антитела *HER2/neu Rabbit Monoclonal (clone 4B5, Ventana, Tuscon, Arizona)*. Након тога следио је процес двоструке хромогене (енгл. *dual chromogen*) *in situ* хибридизације како би се квантификовали HER2 гени као и центромере хромозома 17. HER2 копије гена бојени су употребом сребрне *in situ* хибридизације (енгл. *silver in situ hybridization – SISH*), док су копије хромозома 17 детектоване употребом црвене хромогене *in situ* хибридизације (енгл. *chromogen red in situ hybridization – Red ISH*).

Добијени подаци су обрађени коришћењем софтверског пакета – *IBM SPSS Statistics 20.0*. Приликом статистичке обраде података кориштене су методе дескриптивне статистике и статистичког закључивања. Квантитативна обележја описана су аритметичком средином, медијаном и стандардном девијацијом, а квалитативна фреквенцијама односно процентима. Централни део статистичке обраде односио се на статистичко закључивање како би се установило постојање статистички значајних разлика у резултатима, односно постоји ли значајна зависност између неких појава и то употребом  $\chi^2$ -теста, и *t*-теста. Статистички значајна разлика дефинисана је на нивоу 0,05, а разлика од врло високог статистичког значаја на нивоу од 0,01.

Резултати докторске дисертације су детаљно и систематски представљени у дисертацији, а сажето изнети у закључцима рада. Макрометастазе аксиларних лимфних чворова су биле присутне код 92,7% (38/41) пацијенткиње, док је код преостале 3 одабране пацијенткиње метастатски фокус био премален за адекватну анализу HER2 статуса користећи GPA те су исте искључене из даље студије. Резултати анализе инертуморске хетерогености показују да је један случај са HER2 позитивним примарним тумором имао HER2 негативне метастазе. Додатна два случаја са HER2 позитивним примарним тумором су имала метастазе са граничним статусом генске амплификације без прекомерне експресије протеина. Два случаја са HER2 негативним примарним тумором су такође имала метастазе са граничним статусом амплификације без прекомерне експресије протеина, те се у закључку наводи да је статус HER2 генске амплификације између примарног тумора и његових метастаза у лимфним чворовима био различит код 5 од 38 пацијенткиња тј 13.2%. Интеродална HER2 хетерогеност међу метастазама лимфних чворова анализирана је код 23 од 38 (56,1%) пацијенткиња које су имале више од једног метастатског лимфног чвора и пронађена код 17,4% (4/23) пацијенткиња. Интратуморска (интраодална) хетерогеност и

микрoхетерогеност је анализирана у укупно 108 лимфних чворова и била је статистички сигнификантна ( $p < .001$ ).

На основу изнетих резултата ове докторске дисертације, закључује се да постојећи критеријуми препоручени од стране ASCO/CAP применом прихваћених метода нису довољни за дијагностиковање HER2 позитивности код пацијенткиња које показују интратуморску и интертуморску хетерогеност како у примарним туморима тако и у метастазама, те да постоји статистички високо сигнификантан број макрометастаза лоцираних у лимфним чворовима које показују HER2 хетерогеност. Позитивна корелација постоји између хетерогености нађене у примарним туморима и припадајућим метастазама у лимфним чворовима. Није доказано да HER2 негативни тумори дедиференцирањем „прелазе“ у HER2 позитивне метастазе у лимфним чворовима“. Као посебан закључак кандидат наводи да добијени резултати указују на релативно ретке али значајне разлике у статусу HER2 између примарног карцинома дојке и његових метастаза у аксиларним лимфним чворовима које имају потенцијални утицај на ефекат циљане терапије и исхода.

#### **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

**Наслов рада:** „Молекуларна и генска хетерогеност метастаза у аксиларним лимфним чворовима код пацијенткиња са инвазивним карциномом дојке“.

**Увод** је написан систематично и пружа свеобухватан увид у проблематику обухваћене теме. Дефинише *HER-2* ген и протеин, њихову хетерогеност и методе идентификације. Посебно детаљно је описана молекуларна класификација те прогностички и предиктивни фактори карцинома дојке.

*Комисија сматра да је наслов рада прецизно и јасно формулисан, а у уводном делу је адекватно наговештена и оправдана тема испитивања. Исти је написан разумљиво и систематски и пружа целокупан приказ проблематике којом ће се бавити истраживање.*

**Циљеви истраживања** су јасно и прецизно формулисани и омогућавају доношење конкретних закључака. Основне хипотезе су логичне, јасно дефинисане и имају научно оправдање.

*Комисија сматра да су хипотезе реално постављене у односу на адекватно дефинисане циљеве истраживања.*

**Материјал и методе рада** одговарају принципима методологије научно-

истраживачког рада у медицини. Истраживање је одобрено од стране Етичког одбора Медицинског факултета у Новом Саду као и Етичког комитета Упсале - региона Оребро у Шведској. Прецизно је дефинисан начин избора и величина узорка, критеријуми за укључивање и искључивање из студије. Истраживање је проведено као проспективна студија и обухватила је архивирани биопсијски материјал (парафинске калупе) од 41 пацијенткиње које су оперисане током 2014. и 2015. године због примарног карцинома дојке са макрометастазама у аксиларним лимфним чворовима. Хируршки оперативни материјал тј. ткиво дојке са тумором добијено сегментектомијом и мастектомијом и аксиларни лимфни чворови са присутним метастазама достављени су на Одељење патологије и цитологије у болници округа Даларна, Фалун (Шведска), где је и извршена комплетна патохистолошка дијагностика. Методологија рада је јасно формулисана уз детаљан опис поступка самог извођења. Приказани материјал и методе истраживања су одговарајући и у складу са постављеним циљевима.

*Комисија сматра да су изабране методе адекватне, одговарају постављеним циљевима и омогућавају добијање актуелних у квалитетних научних резултата. Примењене методе статистичке обраде података су примерене и адекватне.*

**Резултати** испитивања јасно приказују претходно текстуално објашњене елементе. Резултати произилазе из примењене методологије уз коришћење савремених статистичких метода. Приказани су табеларно, уверљиво, прегледно и стручно. Може се закључити да су резултати јасно приказани, научно значајни и потпуно разумљиво осликавају истраживану проблематику.

*Комисија сматра да су резултати оригинални и реално приказани, јасни за интерпретацију и свеобухватни. Примењене методе статистичке обраде података су сврсисходне, прецизне и адекватне.*

**Дискусија** је приказана прегледно, исцрпно и детаљно. Стил писања је у складу са српским језиком, јасан, прецизан и разумљив. Кандидат аргументовано и критички анализира резултате и компарира их са резултатима других аутора из релевантне савремене литературе. Коментари и тумачења резултата су логични. Кандидат систематично дискутује сваку целину из поглавља, уз јасна тумачења сопствених резултата и извођења медицински заснованих закључака. Такође је показано завидно познавање литературе у оквиру проблематике којом се бави ова дисертација, уз

критички одабране и уверљиве литературне податке. У дискусији нису утврђене нелогичности.

*Комисија сматра да је дискусија добијених резултата исцрпна, научно утемељена, указује на завидно познавање проблематике уз критички осврт у односу на актуелну литературу.*

**Закључци** су приказани прегледно, темеље се и изведени су из добијених резултата истраживања. На основу изведених закључака евидентно је да су јасно постигнути циљеви истраживања и потврђене радне хипотезе. Закључци истраживања су примењиви како у научном, тако и у стручном погледу.

*Комисија сматра да су закључци логично изведени из резултата истраживања, прегледно изнети и произилазе из добро постављених циљева и примене адекватне методологије.*

**Литература** је дата прегледно и приказана по Ванкуверским правилима на прописан начин кроз релевантне библиографске јединице у односу на испитивану тематику.

*Комисија сматра да су литературни наводи актуелни, адекватно одабрани за компарацију са резултатима актуелног истраживања.*

***Комисија позитивно оцењује све делове докторске дисертације.***

**VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

Baroš Ilija, Tanasković Nataša, Pellas Ulrika, Eri Živka, Tadić Latinović Ljiljana, Tot Tibor. Internodal HER2 heterogeneity of axillary lymph node metastases in breast cancer patients. Bosn J Basic Med Sci. 2019. DOI:<https://dx.doi.org/10.17305/bjbms.2019.3970> (in print).

## **VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА**

На основу добијених резултата истраживања формулисани су јасни закључци наведени у 5 тачака и то редоследом који одговара постављеним циљевима:

1. Постојећи критеријуми препоручени од стране ASCO/CAP применом прихваћених метода нису довољни за дијагностиковање HER2 позитивности код пацијенткиња које показују интратуморску и интертуморску хетерогеност како у примарним туморима тако и у метастазама.
2. Постоји статистички високо сигнификантан број макрометастаза лоцираних у лимфним чворовима које показују HER2 хетерогеност.
3. Постоји позитивна корелација између хетерогености нађене у примарним туморима и припадајућим метастазама у лимфним чворовима.
4. Није доказано да HER2 негативни тумори дедиференцирањем „прелазе“ у HER2 позитивне метастазе у лимфним чворовима“.
5. Наши резултати указују на релативно ретке али значајне разлике у статусу HER2 између примарног карцинома дојке и његових метастаза у аксиларним лимфним чворовима које имају потенцијални утицај на ефекат циљане терапије и исхода. Утицај ретке и суптилне интернодалне HER2 хетерогености која је доказана у овој студији остаје неизвесна. Према томе, чини се да је рационално одредити HER2 статус лимфних чворова, али процена ограниченог броја метастатских чворова може бити недовољна. Потребна су већа и проспективна истраживања да би се потврдила ова запажања.

## **VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**

Резултати истраживања су приказани прегледно и систематично уз коришћење табела које су добро креиране, прегледне и информативне. Добијени резултати су јасно тумачени на основу најновијих доступних научних сазнања, на прикладан начин анализирани и повезани са литературним наводима. Интерпретација резултата је стручна и у складу са подацима из актуелне литературе, детаљно и критички су продискутовани. Закључци произилазе из резултата, адекватни су и научно оправдани, те показују да кандидат добро познаје тематику дисертације.

*Комисија позитивно оцењује начин приказа и тумачење резултата истраживања.*

**IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

На основу претходно изложеног, докторска дисертација је, по мишљењу Комисије, написана у складу са образложењем кандидата наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Докторска дисертација садржи све битне елементе оригиналног научно-истраживачког рада, написана је концизно и разумљиво, а резултат је самосталног истраживања кандидата.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Дисертација даје оригиналан научни допринос како у области патологије дојке тако и у области онкологије. Како кандидат наводи, остаје да се будућим студијама испита хипотеза HER2 микрохетерогености, јер тренутни ставови и истраживања показују да хетерогеност може играти значајну улогу у одређивању одговарајућег избора третмана за HER2 позитивне пацијенткиње са карциномом дојке. Иако се HER2 IHC и HER2 ISH тестови користе за утврђивање тј. селекцију пацијената за HER2 усмерену терапију, тренутно не постоји златни стандард за процену статуса HER2. Различитости резултата HER2 IHC и HER2 ISH анализа су добро познат проблем приликом тестирања HER2 статуса углавном због хетерогености тумора и то највећим делом међу HER2 граничним случајевима. Прецизна идентификација HER2 хетерогености је важан фактор у одлучивању о одговарајућем терапијском приступу. Упркос чињеници да HER2 GPA метод неће решити питање нестандардизованих преаналитичких питања која могу утицати на резултате HER2 тестирања, HER2 GPA метод може дозволити патологу да испита стање HER2 протеина и HER2 гена на индивидуалном ћелијском нивоу, те исте повезати са морфологијом ткива (ћелија) и то чак и у граничним случајевима, а све то јер се статус HER2 протеина и HER2 гена може проценити уз истовремену процену постојања интратуморске HER2 микро-хетерогености. HER2 GPA метод према томе би могао постати крајњи тест за процену HER2 статуса код пацијенткиња са карциномом дојке. Добијени резултати се на изванредан начин могу користити у унапређивању постојећих смерница за евалуацију рецепторског статуса карцинома дојке као и терапијских протокола у случајевима присутне туморске хетерогености.



4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Детаљним увидом Комисија није уочила недостатке који би евентуално утицали на резултате истраживања и умањили вредност докторске дисертације.

**X ПРЕДЛОГ:**

На основу позитивних вредновања појединачних делова као и укупне оцене докторске дисертације, Комисија за оцену докторске дисертације са задовољством предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета у Новом Саду и Сенату Универзитета у Новом Саду, да се докторска дисертација кандидата др Илије Барош, под називом „Молекуларна и генска хетерогеност метастаза у аксиларним лимфним чворовима код пацијенткиња са инвазивним карциномом дојке“ прихвати, а кандидату одобри јавна одбрана.

датум: 15.02.2019.

**ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ**

Проф. др Славица Кнежевић Ушај

---

Проф. др Љиљана Тадић Латиновић

---

Проф. др Татјана Ивковић Капицл

---