

**MEDICINSKI  
FAKULTET**

Adresa: Kruševac bb  
81000 PODGORICA  
CRNA GORA  
Tel: +382 20 246 651  
Fax: +382 20 243 842  
url: [www.ucg.ac.me/medf](http://www.ucg.ac.me/medf)  
E-mail: [infomedf@ac.me](mailto:infomedf@ac.me)



**MEDICAL  
FACULTY**

Address: Kruševac bb  
81000 PODGORICA  
MONTENEGRO  
Phone: +382 20 246 651  
Fax: +382 20 243 842  
url: [www.ucg.ac.me/medf](http://www.ucg.ac.me/medf)  
E-mail: [infomedf@ac.me](mailto:infomedf@ac.me)

Broj: 366/5-1  
Podgorica, 07.03.2022. godine

**Univerzitet Crne Gore  
Odbor za doktorske studije  
n/r predsjednici – prof. dr Biljani Šćepanović**

Poštovana,

U skladu sa stavom 3 člana 35, i člana 55 Pravila doktorskih studija, i tačkom 3.6 . Vodiča za doktorske studije, dostavljamo Odluku Vijeća Medicinskog fakulteta o usvajanju Izveštaja Komisije za ocjenu prijave doktorske disertacije (obrazac D1) i inoviranu Prijavu teme doktorske disertacije, doktoranda dr med Jelene Vučinić.

S poštovanjem.

**MEDICINSKI FAKULTET  
D E K A N**  
Prof. dr Miodrag Radunović

**UNIVERZITET CRNE GORE  
MEDICINSKI FAKULTET  
Broj:366/5  
Podgorica, 03.03.2022. godine**

Na osnovu člana 64 stav 2 tačka 9 Statuta Univerziteta Crne Gore, a u skladu sa članom 35 Pravila doktorskih studija Vijeće Medicinskog fakulteta na sjednici održanoj 03.03.2022. godine donijelo je

**ODLUKU**

1. Usvaja se Izvještaj Komisije za ocjenu prijave doktorske disertacije kandidata mr sc Jelene Vučinić, broj: 38 od 13.01.2022. godine.
2. Predlaže se Senatu UCG da prihvati kao podobnu doktorsku tezu pod nazivom „**Medjusobna korelacija gustine tumor – infiltrišućih limfocita, CD4 i CD8 pozitivnih limfocita i PD-L1 ekspresije i njihova povezanost sa patološkim prognostičkim parametrima u molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke**“ kandidata **dr med Jelene Vučinić**.
3. Odluka Vijeća, Izvještaj Komisije iz tačke 1 ove odluke i novi obrazac Prijave teme doktorske disertacije (obrazac PD broj: 38/1/1 od 13.01.2022. godine) , dostavlja se Centru za doktorske studije i Senatu Univerziteta Crne Gore, na dalju realizaciju.

**OBRAZLOŽENJE**

**Mr sc Jelena Vučinić podnijela je prijavu teme doktorske disertacije pod nazivom “Analiza ekspresije imunoloških markera u molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke” dana 30.08.2021. godine (Broj prijave: 1141).**

Senat Univerziteta Crne Gore na sjednici održanoj 15.12.2021. godine imenovao je Komisiju za ocjenu prijave doktorske disertacije, kandidata mr sc Jelene Vučinić u sastavu: prof. dr Vladimir Todorović, prof. dr Ljiljana Vučković, prof. dr Filip Vukmirović.

Kandidat je pred navedenom Komisijom javno obrazložio ciljeve i očekivane rezultate, odnosno izložio istraživački program doktorske teze, dana 11.01.2022. godine. Komisija je podnijela Vijeću Medicinskog fakulteta Izvještaj o ocjeni podobnosti doktorske disertacije broj:38 od 13.01.2022. godine. Shodno stavu 7 tačke 3.6 Vodiča za doktorske studije, kandidat je postupio po primjedbama Komisije i dostavio inoviranu verziju Prijave teme doktorske disertacije broj: 38/1 od 13.01.2021. godine, sa izmijenjenim nazivom teme.

Vijeće Medicinskog fakulteta na sjednici održanoj 03.03.2022. godine, nakon razmatranja izvještaja Komisije broj: 38 od 13.01.2022. godine i nove Prijave broj: 38/1 od 13.01.2022. godine, odlučilo je kao u dispozitivu ove odluke.

**VIJEĆE MEDICINSKOG FAKULTETA  
PREDSIEDAVAJUĆI,**  
**Prof. dr Miodrag Radunović, dekan**



Na osnovu člana 33 Zakona o upravnom postupku ("Službeni list CG", br. 56/14, 20/15, 40/16 i 37/17), člana 115 Zakona o visokom obrazovanju ("Službeni list CG", br. 44/14, 52/14, 47/15, 40/16, 42/17, 71/17, 55/18, 3/19, 17/19, 47/19, 72/19, 74/20 104/21) i službene evidencije, a po zahtjevu studenta Vučinić Darko Jelena, izdaje se

## UVJERENJE O POLOŽENIM ISPITIMA

Student **Vučinić Darko Jelena**, rođena **11-06-1989** godine u mjestu **Nikšić**, opština **Nikšić**, Republika **Crna Gora**, upisana je studijske **2019/2020** godine, u **I** godinu studija, kao student koji se **samofinansira** na **doktorske akademske studije**, studijski program **MEDICINA**, koji realizuje **MEDICINSKI FAKULTET - Podgorica** Univerziteta Crne Gore u trajanju od **3 (tri)** godine sa obimom **180 ECTS kredita**.

Student je položio ispite iz sljedećih predmeta:

Redni broj	Semestar	Naziv predmeta	Ocjena	Uspjeh	Broj ECTS kredita
1.	1	BIOSTATISTIKA	"A"	(odličan)	10.00
2.	1	MEDICINSKA INFORMATIKA	"A"	(odličan)	10.00
3.	1	METODOLOGIJA NAUČNOG ISTRAŽIVANJA	"A"	(odličan)	10.00
4.	2	OSNOVI ĆELIJSKE BIOLOGIJE	"A"	(odličan)	5.00
5.	2	OSNOVI MOLEKULARNE GENETIKE	"A"	(odličan)	5.00

Zaključno sa rednim brojem **5**.

Ostvareni uspjeh u toku dosadašnjih studija je:

- srednja ocjena položenih ispita "A" (10.00)
- ukupan broj osvojenih ECTS kredita **40.00** ili **66.67%**
- indeks uspjeha **6.67**.

*Uvjerjenje se izdaje na osnovu službene evidencije, a u svrhu ostvarivanja prava na: (dječji dodatak, porodičnu penziju, invalidski dodatak, zdravstvenu legitimaciju, povlašćenu vožnju za gradski saobraćaj, studentski dom, studentski kredit, stipendiju, regulisanje vojne obaveze i slično)*

Broj:  
Podgorica, 07.03.2022 godine



SEKRETAR  
*[Signature]*

## OCJENA PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Mr sci. Jelena Vučinić, dr med.
Fakultet	Medicinski Fakultet u Podgorici
Studijski program	Doktorske studije
Broj indeksa	2/19
Podaci o magistarskom radu	Naziv magistarske teze: „Down-regulation of <i>LAYN</i> , a new promising candidate gene in breast cancer, has the potential to reduce migration in MDA-MB231 triple-negative breast cancer cell line“ Naučna oblast: Ćelijska patologija Institucija: Univerzitet Westminster, London, Ujedinjeno Kraljevstvo Godina završetka: 2017. Srednja ocjena: Distinction (A)
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Službeni jezik	Medusobna korelacija gustine tumor-infiltrirajućih limfocita, CD4 i CD8 pozitivnih limfocita i PD-L1 ekspresije i njihova povezanost sa patološkim prognostičkim parametrima u molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke
Engleski jezik	Correlation between the density of tumor-infiltrating lymphocytes, CD4 and CD8 positive lymphocytes and PD-L1 expression and their connection with pathological prognostic parameters in molecular subtypes of early breast cancer
Datum prihvatanja teme i kandidata na sjednici Vijeća fakulteta	03.03.2022.
Naučna oblast doktorske disertacije	Histopatologija
Za navedenu oblast matični su sljedeći fakulteti	
Medicinski fakultet, Podgorica	
A. IZVJEŠTAJ SA JAVNE ODBRANE POLAZNIH ISTRAŽIVANJA DOKTORSKE DISERTACIJE	
<p>Javna odbrana početnih istraživanja na temu „Analiza ekspresije imunoloških markera u molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke“, kandidatkinje mr sci. Jelene Vučinić, održana je 11.01.2021. godine, sa početkom u 13 časova, u Sali za sastanke Dekanata Medicinskog fakulteta, pred Komisijom u sastavu:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Prof. dr Vladimir Todorović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore – predsjednik komisije</li> <li>2. Prof. dr Ljiljana Vučković, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore – mentor</li> <li>3. Prof. dr Filip Vukmirović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore –</li> </ol>	

član komisije

Uvodnu riječ imao je predsjednik Komisije, prof. dr. Vladimir Todorović, koji je saopštio biografske i druge relevantne podatke iz priložene dokumentacije, nakon čega je kandidatkinja u dvadesetominutnom izlaganju iznijela istraživački program doktorske disertacije.

U uvodnom dijelu izlaganja, kandidatkinja je dala obrazloženje predložene teme, sa najvažnijim do sada ostvarenim rezultatima u oblasti istraživanja. Nakon toga, kandidatkinja je upoznala Komisiju sa planiranim pravcem istraživanja u nastavku rada na disertaciji, konkretizovala ciljeve i hipoteze i objasnila metodološki pristup predloženog istraživanja. U zaključku, kandidatkinja je iznijela dokaze za originalnost i očekivani naučni doprinos istraživanja.

Nakon saslušanog izlaganja kandidatkinje, članovi Komisije za ocjenu teme su dali komentare i sugestije za nastavak rada i postavili pitanja na koja je kandidatkinja uspješno odgovorila (Prilog). Komisija je nakon sprovedenog postupka jednoglasno donijela odluku da je kandidatkinja mr. sci. Jelena Vučinić sa uspjehom odbranila istraživački program doktorske disertacije.

## B. OCJENA PODOBNOSTI TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

### B1. Obrazloženje teme

Karcinom dojke je najčešće dijagnostikovani malignitet i vodeći uzrok smrtnosti u ženskoj populaciji na globalnom nivou (1). Ranim karcinomom smatra se bolest koja je ograničena na dojku, sa ili bez prisustva sekundarnih depozita u limfnim čvorovima pazušne jame i bez prisustva udaljenih metastaza (2). Kako se ne radi o jedinstvenom entitetu, već o veoma heterogenoj grupi tumora sa različitim kliničkim ponašanjem i odgovorom na sve širi spektar terapijskih modaliteta, naponi naučne zajednice su konstantno usmjereni na identifikaciju novih biomarkera, prvenstveno sa ciljem selekcije pacijenata za neki od vidova ciljane terapije (3).

Sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora jedno je od osnovnih obilježja maligniteta (4), pa se posljednjih godina u fokusu interesovanja našao PD-L1 protein, dio signalnog puta uključenog u negativnu regulaciju imunološkog odgovora, kao potencijalni prediktor benefita terapije inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka (5). PD-L1 se na površini tumorskih ćelija može eksprimirati konstitutivno, kao rezultat onkogene mutacije, ali mnogo češće njegovu ekspresiju indukuju medijatori inflamacije produkovani od strane ćelija intratumorskog upalnog infiltrata, koje ga u tim okolnostima najčešće i same eksprimiraju (6).

Do sada je objavljen veliki broj studija sa kontradiktornim rezultatima kada je u pitanju prognostički i prediktivni značaj ekspresije PD-L1 u tumorskim i imunološkim ćelijama karcinoma dojke (7), čime je stavljen akcenat na potrebu daljih istraživanja sa ciljem jasnijeg definisanja njenog kliničkog značaja (7,8,9). Naročito, podaci o povezanosti PD-L1 ekspresije sa karakteristikama intratumorskog upalnog infiltrata u ranom karcinomu dojke su još uvijek veoma ograničeni u dostupnoj literaturi (10).

Uloga imunog sistema u prevenciji razvoja i progresije malignih tumora je odavno prepoznata i veliku pažnju naučne zajednice privlače mehanizmi izbjegavanja imunološkog nadzora od strane tumorskih ćelija. Imuni sistem čini složena mreža efektorskih ćelija, molekula i biohemijskih procesa čija je osnovna uloga odbrana organizma od stranih čestica, uz istovremeno ograničavanje autoreaktivnosti i štetnog dejstva imunih ćelija i pratećeg inflamatornog procesa na sam organizam (11). Ovakav svrsishodan odgovor direktno je uslovljen ravnotežom između kostimulatornih i ko-inhibitornih signala posredovanih članovima B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4 superfamilije proteina (6).

Jedan od članova ove superfamilije je i PD-1 (Programmed death receptor 1), transmembranski protein koji je kao monomer eksprimiran na površini aktiviranih CD4 i CD8 T-limfocita, B-limfocita, NK-ćelija, monocita i pojedinih antigen-prezentujućih ćelija (11). Jedan od njegovih liganada, PD-L1, je prema svojoj strukturi transmembranski glikoprotein koji se, pored konstitutivne ekspresije na površini inflamatornih ćelija, može eksprimirati i na površini

insulocita pankreasa, neurona, keratinocita, sinciciotrofobasta i sl., odnosno u onim tkivima i organima gdje je očuvanje imunološke tolerancije i prevencija razvoja autoimunosti od vitalnog značaja (5). Prenos signala preko PD-1/PD-L1 kompleksa odvija se paralelno sa ostvarivanjem kontakta između T-ćelijskog receptora i antigena prezentovanog u sklopu molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC), sa posljedičnim efektima na ćelijski ciklus i metabolizam T-ćelija (11), koje postaju anergične i ulaze u proces apoptoze (12).

Do sada je identifikovan veliki broj solidnih tumora, poput urotelnog karcinoma, melanoma i nesitnoćelijskog karcinoma pluća, koji kroz ekspresiju PD-L1 na površini ćelija izbjegavaju imunološki nadzor organizma, što ih povezuje sa lošijom prognozom (13-15). Iz tog razloga, mogućnost primjene novog modaliteta ciljne terapije, tzv. inhibitora imunoloških kontrolnih tačaka, kroz upotrebu anti-PD-1/PD-L1 antitijela u blokadi ko-inhibitornih ćelijskih signala i postizanju adekvatnog antitumorskog odgovora T-ćelija, ispituje se u sve većem broju malignih tumora (5). Posebnu pažnju posljednjih godina izazvala su istraživanja potencijalne uloge PD-L1 kao biomarkera u karcinomu dojke, ujedno i najčešćem malignitetu na globalnom nivou i vodećem uzroku smrtnosti od malignih oboljenja u ženskoj populaciji (1).

Odavno je prepoznato da karcinom dojke ne predstavlja jedinstven entitet, već ga čini veoma heterogena grupa tumora sa različitim kliničkim ponašanjem i odgovorom na određene terapijske modalitete (16). Iz tog razloga, danas je u njihovoj rutinskoj patohistološkoj procjeni neizostavna analiza ekspresije određenih markera sa ciljem utvrđivanja pripadnosti nekom od definisanih molekularnih podtipova. Zbog veće ekonomičnosti i dostupnosti u odnosu na molekularne tehnike, u te svrhe se najčešće koristi imunohistohemija, gdje se na osnovu imunofenotipa tumora ocjenjuje i njegov molekularni podtip. Na osnovu imunohistohemijske analize ekspresije steroidnih receptora (za estrogen – ER i progesteron – PR), receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER-2), te procjene proliferativnog indeksa (Ki67) tumorskih ćelija, mogu se razlikovati četiri osnovna imunofenotipa karcinoma dojke: luminal A, luminal B (sa HER-2 negativnom i HER-2 pozitivnom potkategorijom), neluminalni HER-2 pozitivni i trostruko negativni (TNBC) (16).

Pored karakteristika primarnog tumora (histološki tip, stepen diferencijacije, imunofenotip, prisustvo invazije krvnih i limfnih sudova), prognozu i terapijski pristup karcinomu dojke diktira stadijum bolesti, odnosno njena raširenost na regionalne limfne čvorove i udaljena tkiva i organe u vrijeme postavljanja dijagnoze. Stadijum bolesti se u kliničkoj praksi najčešće određuje primjenom TNM stejdžing sistema, koji objedinjuje: T - karakteristike primarnog tumora (dimenzije i/ili lokalnu raširenost), N – prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima i M – prisustvo udaljenih metastaza (17).

Odgovor imunog sistema na prisustvo tumorskih ćelija se ogleda kroz infiltraciju tumora imunološkim ćelijama, u prvom redu stromalnim limfocitima (sTIL), među kojima dominantnu populaciju čine T-limfociti. Smatra se da ključnu ulogu u antitumorskom imunološkom odgovoru imaju citotoksični (CD8) T-limfociti koji, nakon aktivacije od strane CD4 „helper“ T-limfocita, direktno eliminišu tumorske ćelije preko ekspresije Fas liganda na svojoj površini ili oslobađanjem potentnih citotoksina. Međutim, „helper“ limfociti imaju mnogo kompleksniju ulogu u medijaciji antitumorskog imunološkog odgovora jer se, u zavisnosti od predominantnih citokina sekretovanih u tumorskoj mikrookolini, mogu diferencirati u različite podtipove efektorskih ćelija sa potpuno oprečnim ulogama u ovom procesu. (18)

Procjena sTIL na hematoksilin-eozin bojenim preparatima može predstavljati sastavni dio patohistološke analize karcinoma dojke (19). Naime, veća gustina sTIL, kao i prisustvo peritumorskih limfoidnih agregata (8), smatraju se indikatorima povoljnog odgovora na

hemioterapiju i generalno bolje prognoze, naročito kada su u pitanju trostruko-negativni (TNBC) i neluminalni HER-2 pozitivni karcinomi dojke (19,20). Upravo su karcinomi dojke ova dva podtipa, u različitim studijama, upotrebom različitih metoda, identifikovani kao tumori koji češće pokazuju visoku ekspresiju PD-L1 proteina u odnosu na luminalne molekularne podtipove (8). Evaluacija ekspresije PD-L1 u tumorskom tkivu se najčešće vrši mikroskopskom analizom imunohistohemijski bojenih isječaka tumora. U zavisnosti od primijenjenog antitijela, ekspresija se kvantifikuje kao procenat tumorskih ili imunoloških ćelija u tumorskoj mikrookolini koje pokazuju parcijalno ili kompletno membransko, odnosno membransko ili citoplazmatsko bojenje bilo kog intenziteta (21).

Rezultati dosadašnjih studija na karcinomu dojke su ukazali na postojanje povezanosti između PD-L1 ekspresije i negativnih prognostičkih parametara (poput većih dimenzija, višeg gradusa i proliferativne aktivnosti tumora, odsustva ekspresije steroidnih receptora) (10). Međutim, pokazana je i visoko značajna asocijacija između ekspresije PD-L1 i velike gustine TIL, koji predstavlja nezavisan povoljan prognostički faktor u karcinomu dojke (10). Takođe, objavljen je veliki broj studija sa prilično kontradiktornim rezultatima kada je u pitanju prognostički značaj ekspresije PD-L1 u karcinomu dojke (7,10,22), kao i njegoa prediktivna vrijednost u selekciji kandidata za terapiju inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka (7). Mada primjena različite metodologije za evaluaciju ekspresije ovog markera značajno otežava komparabilnost rezultata ovih studija (7), pojedini autori smatraju da je, upravo zbog heterogenosti karcinoma dojke, procjena ekspresije PD-L1 unutar samo jedne ćelijske populacije insuficijentan marker (7,8), odnosno da je dijagnostička informacija kompletnija ukoliko se ekspresija paralelno procjenjuje i u tumorskim ćelijama i u ćelijama tumorske mikrookoline (8).

Naime, povećana ekspresija PD-L1 na površini tumorskih ćelija može biti konstitutivna – kao posljedica onkogene mutacije, ili inducibilna – kao odgovor na prisustvo interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) produkujućih T-limfocita u tumorskoj mikrookolini (6). Pojedini autori su ukazali na mogućnost razlikovanja ova dva obrasca prekomjerne ekspresije PD-L1 na osnovu rezultata imunohistohemijskog bojenja. Tako bi intenzivno i homogeno bojenje u gotovo svim tumorskim ćelijama ukazivalo na konstitutivnu ekspresiju, dok bi mrljasto bojenje tumorskih ćelija ograničeno na invazivni front i neposrednu blizinu stromalnih inflamatornih ćelija, koje se i same često boje mnogo intenzivnije od tumorskih, ukazivalo na inducibilnu ekspresiju PD-L1 proteina (6). U skladu sa osnovnim principima onkogeneze, različiti obrasci PD-L1 ekspresije bi mogli imati različite efekte na biološko ponašanje tumora, ali i različitu vrijednost kao prediktivni markeri u selekciji pacijentkinja koje bi eventualno imale korist od terapije inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka (6). Osim toga, pojedini autori su mišljenja da bi i sastav intratumorskog inflamatornog infiltrata mogao biti od značaja prilikom selekcije pacijentkinja za ovaj vid ciljane terapije (23), što podržavaju brojne studije čiji su rezultati doveli u vezu predominaciju CD4 T-limfocita i visok CD4/CD8 odnos u upalnom infiltratu sa nepovoljnim ishodom kod karcinoma dojke (24).

Sve ovo govori u prilog značaja procjene PD-L1 ekspresije u tumorskim i imunološkim ćelijama, sa posebnim osvrtom na gustinu i karakteristike intratumorskog inflamatornog infiltrata (6), sa ciljem njegove optimizacije kao biomarkera u kliničkoj primjeni. Međutim, podaci o povezanosti PD-L1 ekspresije i karakteristika intratumorskog upalnog infiltrata su veoma ograničeni u dostupnoj literaturi, naročito kada je u pitanju rani karcinom dojke (10).

## B2. Cilj i hipoteze

Ciljevi dokorskog istraživanja su:

1. Utvrditi obrasce ekspresije PD-L1 proteina u tumorskim ćelijama (konstitutivna/inducibilna) različitih molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke.

2. Ispitati postojanje razlika u obrascu PD-L1 ekspresije (tumorske i imunološke ćelije) između molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke.
3. Ispitati povezanost različitih obrazaca PD-L1 ekspresije sa gustom sTIL i prisustvom CD4+ i CD8+ tumor-infiltrirajućih limfocita u ranom karcinomu dojke.
4. Ispitati povezanost različitih obrazaca PD-L1 ekspresije sa patološkim prognostičkim parametrima (veličinom i histološkim gradusom tumora, Ki67 indeksom proliferacije i statusom steroidnih receptora i HER2 i patološkim TNM stadijumom) kod ranog karcinoma dojke.

Na osnovu navedenih ciljeva, postavljene su sljedeće hipoteze:

H1: Postoje razlike u obrascima PD-L1 ekspresije u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke.

H2: PD-L1 se češće eksprimira u karcinomima dojke sa većom gustom sTIL.

H3: Različiti obrasci PD-L1 ekspresije povezani su sa različitom gustom i sastavom sTIL

(CD4 i CD8 T limfocita) u ranom karcinomu dojke.

H4: Obrasci PD-L1 ekspresije pokazuju razlike u odnosu na patološke prognostičke parametre (veličinu i histološki gradus tumora, status steroidnih receptora, Ki67 indeks proliferacije, status HER2 receptora, TNM stadijum i molekularni podtip) u ranom karcinomu dojke.

### B3. Metode i plan istraživanja

#### Uzorak:

Planirano istraživanje je dizajnirano kao retrospektivna deskriptivna studija, koja će obuhvatiti sve pacijentkinje kojima je u Centru za patologiju Kliničkog centra Crne Gore, u periodu od 01.01.2016. do 31.12.2021. godine, na operativnom materijalu dijagnostikovani invazivni karcinom dojke stadijuma IA-IIIa (prema osmom izdanju TNM klasifikacije), sa poznatim statusom HER-2, estrogenih i progesteronskih receptora (ER i PR), kao i vrijednošću Ki67 indeksa proliferacije, a koje nijesu prethodno primale neoadjuvantnu terapiju i kod kojih u dostupnim arhiviranim parafinskim kalupima ima dovoljno materijala za planiranu dalju imunohistohemijsku analizu.

Pored patohistoloških nalaza iz arhive Centra za patologiju, kao izvor podataka biće korišćena i medicinska dokumentacija Instituta za onkologiju Kliničkog centra Crne Gore.

Pregledom patohistoloških izvještaja sa podacima o stepenu imunohistohemijske ekspresije ER i PR, HER-2 statusu i Ki67 indeksu proliferacije, a prema St. Gallen konsenzusu (2), biće određena pripadnost tumora jednom od pet imunofenotipova (Luminal A, Luminal B HER-2 pozitivni, Luminal B HER-2 negativni, neluminalni HER-2 pozitivni i trostruko-negativni), na osnovu čega će pacijentkinje biti razvrstane u pet grupa. Uzorak će biti formiran tako da se unutar svake od navedenih grupa nalazi jednak broj pacijentkinja, sa istom prosječnom starošću.

#### Analiza HE bojenih histoloških preparata:

Pregledom arhiviranih mikroskopskih pločica bojenih tehnikom hematoksilin-eozin biće potvrđen histološki tip i gradus tumora, kvantifikovano prisustvo sTIL (kao procenat tumorske strome prekrivene limfocitima) i evidentirano prisustvo peritumorskih limfoidnih agregata. Po uzoru na metodologiju Cimino-Mathews i saradnika (8), stromalni limfocitni infiltrat (sTIL) će biti skorovan kao: odsutan, oskudan (<5% strome tumora), umjeren (fokalan infiltrat u 5-50% strome tumora) i gust (difuzan infiltrat u ≥50% strome tumora), a peritumorski limfoidni agregati kao: odsutni, fokalni (rijetke izolovane nakupine limfoidnih ćelija), umjereno razvijeni (multipli limfoidni agregati) i dobro razvijeni (multipli agregati sa dobro razvijenim



germinativnim centrima).

**Formiranje tkivnih mikrosječaka (TMA):**

Za svaku od pacijentkinja, sa invazivnog fronta tumora, iz arhiviranih parafinskih kalupa će biti formirana po dva tkivna mikrosječka promjera 3 mm, upotrebom Quick Ray Manual Tissue Microarrayer seta. Dobijeni preparati će najprije biti bojeni standardnom HE tehnikom, kako bi se potvrdila adekvatnost uzorka i olakšala orijentacija prilikom interpretacije imunohistohemijskih bojenja.

**Imunohistohemija:**

Dobijeni TMA će biti bojeni imunohistohemijski upotrebom CD4 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD4, Clone 4B12, DAKO) i CD8 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, T-cell, Clone C8/144B, DAKO) antitijela na DAKO Autostainer Link 48 platformi i PD-L1 (Monoclonal Rabbit Anti-Human PD-L1, Clone SP142, Roche/Ventana medical systems) antitijelom na Ventana Benchmark Ultra automatizovanoj platformi, prema uputstvima proizvođača. Kao spoljašnja pozitivna kontrola imunohistohemijskog bojenja biće korišćeno tkivo tonzile.

Broj CD4 i CD8 pozitivnih sTIL po mm<sup>2</sup> će biti izračunat kao srednja vrijednost nakon brojanja navedenih ćelija u oba mikrosječka svakog pojedinačnog tumora i dobijene vrijednosti će biti korišćene za izračunavanje CD4/CD8 odnosa.

Prilikom kvantifikacije PD-L1 ekspresije u tumorskim i imunološkim ćelijama u obzir će se uzeti one ćelije koje pokazuju parcijalno ili kompletno membransko, odnosno membransko ili citoplazmatsko bojenje bilo kog intenziteta. Ekspresija PD-L1 u tumorskim ćelijama će biti kvantifikovana primjenom TPS algoritma skorovanja (tumor proportion score - odnos broja PD-L1 pozitivnih tumorskih ćelija prema ukupnom broju vitalnih tumorskih ćelija, pomnožen sa 100%), dok će za kvantifikaciju ekspresije u imunološkim ćelijama biti korišćen ICS algoritam (immune cell score - procenat svih PD-L1 pozitivnih imunih ćelija u ukupnoj površini koju zauzima tumor). (7) Krajnji rezultat će predstavljati srednja vrijednost TPS i ICS očitanih sa oba mikrozreza svakog pojedinačnog tumora. Prema trenutno važećem protokolu za procjenu PD-L1 ekspresije u metastatskom TNBC, pozitivnim nalazom u imunološkim ćelijama će se smatrati ICS  $\geq 1\%$  (7), dok će TPS  $\geq 1\%$  označavati pozitivnu PD-L1 ekspresiju u tumorskim ćelijama.

**Statistička analiza:**

Za određivanje značajnosti razlike kvantitativnih varijabli (starosna dob - u godinama; veličina tumora - u mm; Ki67 proliferativni indeks - u procentima; broj CD4 i CD8 pozitivnih sTIL i CD4/CD8 odnos) u odnosu na obrazac ekspresije PD-L1 proteina biće korišćen t-test, dok će za određivanje značajnosti razlike kvalitativnih varijabli (gradus, gustina sTIL i peritumorskih limfoidnih agregata, imunofenotip, status hormonskih receptora i HER-2) u odnosu na ekspresiju PD-L1 proteina biti korišćen hi-kvadrat test.

Za ispitivanje povezanosti svih pomenutih varijabli sa ekspresijom PD-L1 biće korišćena metoda logističke regresije.

Zaključivanje o statističkim hipotezama u ovom radu sprovedeće se uz nivo značajnosti  $p \leq 0.05$ .

**B4. Naučni doprinos**

S obzirom na epidemiološki značaj karcinoma dojke u ženskom dijelu populacije, kao i prepoznatu ulogu imunog sistema u progresiji malignih tumora, predloženo istraživanje će doprinijeti boljem razumijevanju ekspresije konstituenata imunološkog odgovora kao što je PD-L1 protein, prisustvo tumor infiltrišućih limfocita, te CD4 i CD8 T- limfocita u tumorskom tkivu.

Rasvjetljavanjem povezanosti obrasca PD-L1 ekspresije sa gustinom i sastavom intratumorskog limfocitnog infiltrata u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke, želimo dati svoj doprinos trenutno insuficijentnoj naučnoj literaturi, ali i procesu optimizacije upotrebe PD-L1 kao prognostičkog i prediktivnog biomarkera u karcinomu dojke.

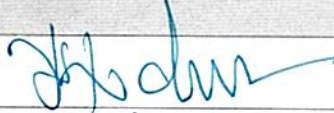
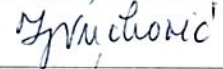
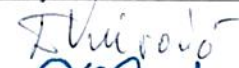
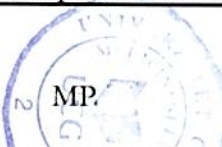
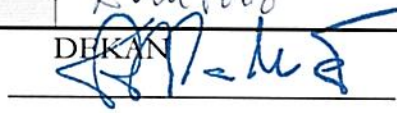
#### **B5. Finansijska i organizaciona izvodljivost istraživanja**

Istraživanje će biti sprovedeno u Centru za patologiju Kliničkog centra Crne Gore u Podgorici. Svi potrebni podaci i aparatura su kandidatkinji na raspolaganju, a kandidatkinja će eventualne troškove hemikalija i potrošnog materijala neophodnog za izvođenje laboratorijskog dijela istraživanja finansirati lično i iz sredstava dodijeljenih od strane Ministarstva prosvjete Crne Gore, po osnovu Konkursa za sufinansiranje doktorskih studija.

#### **B6. Spisak referenci**

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 Feb;71(3):209-249.
2. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019 Aug;30(8):1194-1220.
3. Planes-Laine G, Rochigneux P, Bertucci F, Chrétien AS, Viens P, Sabatier R, et al. PD-1/PD-L1 targeting in breast cancer: the first clinical evidences are emerging—a literature review. *Cancers.* 2019 Jul;11(7):1033.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar;144(5):646-674.
5. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1: PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. *Front Immunol.* 2016 Dec;7:550.
6. Ribas A, Hu-Lieskovan S. What does PD-L1 positive or negative mean? *J Exp Med.* 2016 Nov;213(13):2835-2840.
7. Stovgaard ES, Dyhl-Polk A, Roslind A, Balslev E, Nielsen D. PD-L1 expression in breast cancer: expression in subtypes and prognostic significance: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Jan;174(3):571-584.
8. Cimino-Mathews A, Thompson E, Taube JM, Ye X, Lu Y, Meeker A, et al. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Hum Pathol.* 2016 Jan;47(1):52-63.
9. Erber R, Hartmann A. Understanding PD-L1 Testing in Breast Cancer: A Practical Approach. *Breast Care.* 2020 Oct;15(5):1-10.
10. Kitano A, Ono M, Yoshida M, Noguchi E, Shimomura A, Shimoi T, et al. K. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO open.* 2017 May;2(2):e000150.
11. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(21):9543-9553.
12. Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Konishi I. Dual faces of IFN $\gamma$  in cancer progression: a role of PD-L1 induction in the determination of pro-and antitumor immunity. *Clin Cancer Res.* 2016 May;22(10):2329-2334.
13. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Dec;56(8):1173-1182.
14. Hino R, Kabashima K, Kato YU, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell

<p>expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. <i>Cancer</i>. 2010 Apr;116(7):1757-1766.</p> <p>15. Anagnostou VK, Brahmer JR. Cancer immunotherapy: a future paradigm shift in the treatment of non-small cell lung cancer. <i>Clin Cancer Res</i>. 2015 Mar;21(5):976-984.</p> <p>16. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. <i>Nature</i>. 2000 Aug;406(6797):747-752.</p> <p>17. Hayes DF, Isaacs C, Stearns V. Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. <i>J Mammary Gland Biol Neoplasia</i>. 2001 Oct;6(4):375-392.</p> <p>18. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M., Kühnel F, Woller N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. <i>Cell Mol Life Sci</i>, 2017 Oct;75(4):689-713.</p> <p>19. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. <i>J Clin Oncol</i>. 2010 Jan;28(1):105-113.</p> <p>20. Gao G, Wang Z, Qu X, Zhang Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. <i>BMC cancer</i>. 2020 Mar;20(1):1-</p> <p>21. Peg V, López-García MÁ, Comerma L, Peiro G, Garcia-Caballero T, Lopez AC, Rojo F. PD-L1 testing based on the SP142 antibody in metastatic triple-negative breast cancer: summary of an expert round-table discussion. <i>Future Oncol</i>. 2020 Dec;17(10):1209-1218.</p> <p>22. Muenst S, Schaefer AR, Gao F, Däster S, Trella E, Droezer RA, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. <i>Breast Cancer Res Treat</i>. 2014 May;146(1):15-24.</p> <p>23. Gisterek I, Frydecka I, Świątoniowski G, Fidler S, Kornafel J. Tumour-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. <i>Rep Pract Oncol Radiother</i>. 2008 Jul;13(4):206-209.</p> <p>24. Huang Y, Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, Peng G. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. <i>Oncotarget</i>. 2015 Jul;6(19):17462.</p>
<p><b>Mišljenje i prijedlog komisije</b></p> <p>Nakon uvida u priloženu dokumentaciju, izlaganja kandidatkinje i diskusije, Komisija je mišljenja da akademski kvalitet kandidata, kao i predložena tema prema sadržaju i kompleksnosti, odgovaraju nivou doktorskih studija. Plan istraživanja doktorske teze je dobro osmišljen, a ciljevi, metodologija i očekivani naučni doprinos izneseni jasno i precizno.</p> <p>Komisija je dala predlog da se izmijeni naslov doktorske teze, kako bi preciznije oslikavao suštinu samog dokorskog istraživanja i da se, zbog kvaliteta statističke analize, razmotri povećanje broja pacijentkinja koje će biti obuhvaćene istraživanjem na način što će se u obzir uzeti i arhivirani materijal Centra za patologiju za duži vremenski period.</p> <p>Na osnovu svega navedenog, Komisija predlaže Vijeću Medicinskog fakulteta i Senatu Univerziteta Crne Gore da prihvate ovaj izvještaj i odobre kandidatkinji nastavak istraživačkog rada na doktorskoj disertaciji.</p>
<p><b>Predlog izmjene naslova</b></p> <p>Komisija predlaže da se naslov doktorske disertacije iz „Analiza ekspresije imunoloških markera u molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke“ promijeni u „Međusobna korelacija gustine tumor-infiltrirajućih limfocita, CD4 i CD8 pozitivnih limfocita i PD-L1 ekspresije i njihova povezanost sa patološkim prognostičkim parametrima u molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke“.</p>
<p><b>Prijedlog promjene mentora i/ili imenovanje drugog mentora</b></p> <p>/</p>

<b>Planirana odbrana doktorske disertacije</b>		
Ljetnji semestar akademske 2022./2023.		
<b>Izdvojeno mišljenje</b>		
(popuniti ukoliko neki član komisije ima izdvojeno mišljenje)		
		Ime i prezime
<b>Napomena</b>		
/		
<b>ZAKLJUČAK</b>		
Predložena tema po svom sadržaju <b>odgovara</b> nivou doktorskih studija	<b>DA</b>	<b>NE</b>
Tema <b>omogućava izradu</b> originalnog naučno-istraživačkog rada koji odgovara međunarodnim kriterijumima kvaliteta disertacije.	<b>DA</b>	<b>NE</b>
Kandidat <b>može</b> na osnovu sopstvenog akademskog kvaliteta i stečenog znanja da uz adekvatno mentorsko vođenje realizuje postavljeni cilj	<b>DA</b>	<b>NE</b>
<b>Komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata</b>		
Prof. dr Vladimir Todorović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, naučna oblast: onkologija		
Prof. dr Ljiljana Vučković, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, oblast: histologija i embriologija		
Prof. dr Filip Vukmirović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, naučna oblast: patološka anatomija		
U Podgorici, 11.01.2021. godine		DEKAN 

## PRILOG

PITANJA KOMISIJE ZA OCJENU PODOBNOSTI TEME I KANDIDATA	
Prof. dr Filip Vukmirović	<p>Na koji način će se vršiti kvantifikacija CD4 i CD8 pozitivnih limfocita u sTIL?</p> <p>Koje će analize biti vršene na mikroskopskim pločicama sa originalnim isječcima, a koje na pločicama sa tkivnim mikroisječcima?</p> <p>Da li već imate podatak o broju pacijentkinja koje bi bile obuhvaćene istraživanjem na osnovu pregleda arhiviranog materijala Centra za patologiju između 2016. i 2020. godine?</p>
Prof. dr Vladimir Todorović	<p>Imajući u vidu trenutno važeće terapijske protokole kada je u pitanju imunoterapija ranog karcinoma dojke, da li smatrate da je opravdano u doktorsko istraživanje uključiti sve molekularne podtipove karcinoma dojke?</p> <p>Da li u tom slučaju treba preispitati veličinu uzorka, prvenstveno zbog kvaliteta podataka do kojih će se doći statističkom analizom?</p> <p>Da li ste razmišljali o tome da u doktorsko istraživanje uključite i podatke o kliničkom praćenju pacijentkinja?</p> <p>Da li je postojao još neki marker čiju bi ekspresiju bilo interesantno analizirati u korelaciji sa pomenutim imunološkim markerima?</p>
PITANJA PUBLIKE DATA U PISANOJ FORMI	
(Ime i prezime)	/
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
ZNAČAJNI KOMENTARI	
/	



MEDICINSKI FAKULTET			
Primijeno:	13.01.2022		
Org. jed.	Broj	Prilog	Vrijednost
med	38/1		

UNIVERZITET CRNE GORE  
Obrazac PD: Prijava teme doktorske disertacije

## PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Mr sci. Jelena Vučinić, dr med.
Fakultet	Medicinski fakultet
Studijski program	Medicina
Broj indeksa	2/19
Ime i prezime roditelja	Darko Vučinić
Datum i mjesto rođenja	11.06.1989. Nikšić
Adresa prebivališta	Murtezira Karadžuzovića 28/14; 81000 Podgorica
Telefon	067/558-305
E-mail	drjelena989@gmail.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>2016. – 2020.</b> Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija Specijalističke studije iz oblasti patološke anatomije Zvanje: specijalista patologije Prosječna ocjena: odličan (A)</li><li>• <b>2016. – 2017.</b> Univerzitet Westminster, London, Ujedinjeno Kraljevstvo Odsjek: Biomedicinske nauke Smjer: Čelijska patologija Zvanje: Magistar biomedicinskih nauka (čelijske patologije) Prosječna ocjena: A („distinction“) Naziv disertacije: „Down-regulation of <i>L4YN</i>, a new promising candidate gene in breast cancer, has the potential to reduce migration in MDA-MB231 triple-negative breast cancer cell line“</li><li>• <b>2008. – 2014.</b> Medicinski fakultet, Univerzitet Crne Gore, Podgorica Smjer: Medicina Zvanje: doktor medicine Prosječna ocjena: A (9,71)</li><li>• <b>2004. – 2008.</b> Gimnazija „Stojan Cerović“, Nikšić, Crna Gora Prirodno-matematički smjer Prosječna ocjena: 5,00 (nosilac diplome „Luča“)</li><li>• <b>1998. – 2004.</b> Muzička škola „Dara Čokorilo“, Nikšić, Crna Gora Odsjek: violina Prosječna ocjena: 5,00</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>1996. – 2004.</b>          Osnovna škola „Luka Simonović“, Nikšić, Crna Gora          Prosječna ocjena: 5,00 (nosilac diplome “Luča”)</li> </ul>
Radno iskustvo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>21.11.2020. –</b>          Specijalista patologije u Centru za patologiju Kliničkog centra Crne Gore</li> <li>• <b>1.10.2017. -</b>          Saradnik u nastavi na predmetu Histologija i embriologija, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet u Podgorici</li> <li>• <b>15.07.2016. – 20.11.2020.</b>          Specijalizant patologije:         <ul style="list-style-type: none"> <li>- Odjeljenje za histopatologiju, Centar za patologiju, KCCG</li> <li>- Odjeljenje za histopatologiju, Institut za plućne bolesti u Sremskoj Kamenici</li> <li>- Odjeljenje za histopatologiju, Institut za onkologiju u Sremskoj Kamenici</li> <li>- Odjeljenje za histopatologiju, Klinički centar Vojvodine</li> </ul> </li> <li>• <b>15.09.2016. – 30.05.2017.</b>          Saradnik u nastavi na predmetu Primijenjena patološka biologija, Univerzitet Vestminster, London, Ujedinjeno Kraljevstvo</li> <li>• <b>14.02.2016. – 31.07.2017.</b>          Odjeljenje za genomiku karcinoma dojke, Univerzitet Vestminster, London, Ujedinjeno Kraljevstvo          Istraživač (student magistarskih studija)          Stečene vještine: rad na ćelijskoj kulturi, ekstrakcija RNK i reverzna transkripcija, molekularne tehnike (konvencionalni PCR, qRT-PCR, izvođenje genetskog knock-down-a metodom RNK interferencije – DsiRNA), fluorescentna mikroskopija, metabolički testovi citotoksičnosti i proliferacije (alamarBlue™), in vitro testovi ćelijske migracije (test zarastanja rane i Boyden komore).</li> <li>• <b>15.07.2015. – 14.07.2016.</b>          Klinički ljekar na Odjeljenju patologije, Centar za patologiju i sudsku medicinu, KCCG</li> <li>• <b>01.07.2014. – 01.04.2015.</b>          Pripravnički staž u J.Z.U. Dom zdravlja Nikšić i J.Z.U. Opšta bolnica Nikšić.</li> </ul>
Popis radova	<p><b>Naučni radovi koji se citiraju u međunarodnim bazama:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vučković L, Klisic A, Raonić J, <b>Vučinić, J.</b> Comparative study of immunohistochemical determination of breast cancer molecular subtypes on core biopsy and surgical specimens. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2021 Jun;25:3990-3996.</li> <li>• Restović I, Bočina I, Vukojević K, Kero D, Raonić J, <b>Vučinić J,</b> et</li> </ul>

al. Time course and expression pattern of the neuronal markers in the developing human spinal cord. *Int J Dev Neurosci.* 2019 Feb;74:1-10.

- Radnic B, Radojevic N, **Vucinic J**, Duborija-Kovacevic N. The association between pro-arrhythmic agents and aortic stenosis in young adults: is it sufficient to clarify the sudden unexpected deaths? *Cardiol Young.* 2017 Jul;27(5):929-935.
- Radojevic N, Radnic B, **Vucinic J**, Cukic D, Lazovic R, Asanin B, et al. Mathematical model in post-mortem estimation of brain edema using morphometric parameters. *J Forensic Leg Med.* 2017 Jan;45:21-28.
- Radunović M, Radojević N, Rakočević V, **Vučinić J**, Čurović I. Clinical and autopsy findings of the homeless. *Srp Arh Celok Lek.* 2017 Mar;145(9-10):508-512.

**Naučni radovi prezentovani na kongresima:**

- **Vučinić J**, Raonić J, Vučković Lj, Vukmirović F, Golubović M, Nenezić T, Kavarić P. Metastaza u gornjem urinarnom traktu kao inicijalna prezentacija invazivnog lobularnog karcinoma dojke. XXVI Nacionalni kongres UPCS, Zlatibor, Srbija, 18.-19.4.2018. *Materia Medica* 2018;34(1):65-6;
- Nenezić T, Vukmirović F, Vučković Lj, Čulafić T, Golubović M, Raonić J, **Vučinić J**. Karcinosarkom pluća: prikaz slučaja. XXVI Nacionalni kongres UPCS, Zlatibor, Srbija, 18.-19.4.2018. *Materia Medica* 2018;34(1):49;
- Raonić J, Vučković Lj, **Vučinić J**, Vukmirović F, Golubović M, Nenezić T, Čulafić T, Miladinović M. Pouzdanost određivanja ekspresije steroidnih receptora, receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 i molekularnog podtipa tumora u core biopsiji dojke. XXVI Nacionalni kongres UPCS, Zlatibor, Srbija, 18.-19.4.2018. *Materia Medica* 2018;34(1):43;
- Radojevic N, **Vucinic J**, Cukic D. Double-Induced Suicide of a Father and Adult Daughter: A Case Report. Proceeding od the LXIX Annual Meeting of the American Academy of Forensic Science; 2017 February 13-18; New Orleans, USA.
- **Vucinic J**, Radojevic N, Cukic D. Toxicological Findings in Choking in Adult Psychiatry Patients. Proceeding od the LXIX Annual Meeting of the American Academy of Forensic Science; 2017 February 13-18; New Orleans, USA.
- Vučković Lj, Raonić J, Vukmirović F, Golubović M, Nenezić T, Čulafić T, Miladinović M, **Vučinić J**. Immunohistochemical determination of breast cancer molecular subtypes in the Clinical center of Montenegro. 29<sup>th</sup> European Congress of Pathology,



	<p>Amsterdam, Netherlands, 2.-6-9-2017. Virchow Archiv;471(1):S67.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Vučinić J, Vučković Lj, Zvrko E.</b> Metastaza karcinoma dojke u pljuvačnoj žlijezdi – prikaz slučaja. XV kongres ljekara Crne Gore sa međunarodnim učešćem. Bečići, 21-25.10.2015. Medicinski zapisi (Medical essays) 2015;64(1):216;</li> </ul>
<b>NASLOV PREDLOŽENE TEME</b>	
Na službenom jeziku	Međusobna korelacija gustine tumor-infiltrirajućih limfocita, CD4 i CD8 pozitivnih limfocita i PD-L1 ekspresije i njihova povezanost sa patološkim prognostičkim parametrima u molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke
Na engleskom jeziku	Correlation between the density of tumor-infiltrating lymphocytes, CD4 and CD8 positive lymphocytes and PD-L1 expression and their connection with pathological prognostic parameters in molecular subtypes of early breast cancer
<b>Obrazloženje teme</b>	
<p>Karcinom dojke je najčešće dijagnostikovano malignitet i vodeći uzrok smrtnosti u ženskoj populaciji na globalnom nivou (1). Ranim karcinomom smatra se bolest koja je ograničena na dojk, sa ili bez prisustva sekundarnih depozita u limfnim čvorovima pazušne jame i bez prisustva udaljenih metastaza (2). Kako se ne radi o jedinstvenom entitetu, već o veoma heterogenoj grupi tumora sa različitim kliničkim ponašanjem i odgovorom na sve širi spektar terapijskih modaliteta, napori naučne zajednice su konstantno usmjereni na identifikaciju novih biomarkera, prvenstveno sa ciljem selekcije pacijenata za neki od vidova ciljane terapije (3).</p> <p>Sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora jedno je od osnovnih obilježja maligniteta (4), pa se posljednjih godina u fokusu interesovanja našao PD-L1 protein, dio signalnog puta uključenog u negativnu regulaciju imunološkog odgovora, kao potencijalni prediktor benefita terapije inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka (5). PD-L1 se na površini tumorskih ćelija može eksprimirati konstitutivno, kao rezultat onkogene mutacije, ali mnogo češće njegovu ekspresiju indukuju medijatori inflamacije produkovani od strane ćelija intratumorskog upalnog infiltrata, koje ga u tim okolnostima najčešće i same eksprimiraju (6).</p> <p>Do sada je objavljen veliki broj studija sa kontradiktornim rezultatima kada je u pitanju prognostički i prediktivni značaj ekspresije PD-L1 u tumorskim i imunološkim ćelijama karcinoma dojke (7), čime je stavljen akcenat na potrebu daljih istraživanja sa ciljem jasnijeg definisanja njenog kliničkog značaja (7,8,9). Naročito, podaci o povezanosti PD-L1 ekspresije sa karakteristikama intratumorskog upalnog infiltrata u ranom karcinomu dojke su još uvijek veoma ograničeni u dostupnoj literaturi (10).</p>	
<b>Pregled istraživanja</b>	
<p>Uloga imunog sistema u prevenciji razvoja i progresije malignih tumora je odavno prepoznata i veliku pažnju naučne zajednice privlače mehanizmi izbjegavanja imunološkog nadzora od strane tumorskih ćelija. Imuni sistem čini složena mreža efektorskih ćelija, molekula i biohemijskih procesa čija je osnovna uloga odbrana organizma od stranih čestica, uz istovremeno ograničavanje autoreaktivnosti i štetnog dejstva imunih ćelija i pratećeg inflamatornog procesa na sam organizam (11). Ovakav svrsishodan odgovor direktno je uslovljen ravnotežom između ko-stimulacionih i ko-inhibicionih signala posredovanih članovima B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4 superfamilije proteina (6).</p>	

Jedan od članova ove superfamilije je i PD-1 (Programmed death receptor 1), transmembranski protein koji je kao monomer ekspimiran na površini aktiviranih CD4 i CD8 T-limfocita, B-limfocita, NK-ćelija, monocita i pojedinih antigen-prezentujućih ćelija (11). Jedan od njegovih liganada, PD-L1, je prema svojoj strukturi transmembranski glikoprotein koji se, pored konstitutivne ekspresije na površini inflamatornih ćelija, može ekspimirati i na površini insulocita pankreasa, neurona, keratinocita, sinciciotrofobasta i sl., odnosno u onim tkivima i organima gdje je očuvanje imunološke tolerancije i prevencija razvoja autoimunosti od vitalnog značaja (5). Prenos signala preko PD-1/PD-L1 kompleksa odvija se paralelno sa ostvarivanjem kontakta između T-ćelijskog receptora i antigena prezentovanog u sklopu molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC), sa posljedičnim efektima na ćelijski ciklus i metabolizam T-ćelija (11), koje postaju anergične i ulaze u proces apoptoze (12).

Do sada je identifikovan veliki broj solidnih tumora, poput urotelnog karcinoma, melanoma i nesitnoćelijskog karcinoma pluća, koji kroz ekspresiju PD-L1 na površini ćelija izbjegavaju imunološki nadzor organizma, što ih povezuje sa lošijom prognozom (13-15). Iz tog razloga, mogućnost primjene novog modaliteta ciljne terapije, tzv. inhibitora imunoloških kontrolnih tačaka, kroz upotrebu anti-PD-1/PD-L1 antitijela u blokadi ko-inhibitornih ćelijskih signala i postizanju adekvatnog antitumorskog odgovora T-ćelija, ispituje se u sve većem broju malignih tumora (5). Posebnu pažnju posljednjih godina izazvala su istraživanja potencijalne uloge PD-L1 kao biomarkera u karcinomu dojke, ujedno i najčešćem malignitetu na globalnom nivou i vodećem uzroku smrtnosti od malignih oboljenja u ženskoj populaciji (1).

Odavno je prepoznato da karcinom dojke ne predstavlja jedinstven entitet, već ga čini veoma heterogena grupa tumora sa različitim kliničkim ponašanjem i odgovorom na određene terapijske modalitete (16). Iz tog razloga, danas je u njihovoj rutinskoj patohistološkoj procjeni neizostavna analiza ekspresije određenih markera sa ciljem utvrđivanja pripadnosti nekom od definisanih molekularnih podtipova. Zbog veće ekonomičnosti i dostupnosti u odnosu na molekularne tehnike, u te svrhe se najčešće koristi imunohistohemija, gdje se na osnovu imunofenotipa tumora ocjenjuje i njegov molekularni podtip. Na osnovu imunohistohemijske analize ekspresije steroidnih receptora (za estrogen – ER i progesteron – PR), receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER-2), te procjene proliferativnog indeksa (Ki67) tumorskih ćelija, mogu se razlikovati četiri osnovna imunofenotipa karcinoma dojke: luminal A, luminal B (sa HER-2 negativnom i HER-2 pozitivnom potkategorijom), neluminalni HER-2 pozitivni i trostruko negativni (TNBC) (16).

Pored karakteristika primarnog tumora (histološki tip, stepen diferencijacije, imunofenotip, prisustvo invazije krvnih i limfnih sudova), prognozu i terapijski pristup karcinomu dojke diktira stadijum bolesti, odnosno njena raširenost na regionalne limfne čvorove i udaljena tkiva i organe u vrijeme postavljanja dijagnoze. Stadijum bolesti se u kliničkoj praksi najčešće određuje primjenom TNM stejdžing sistema, koji objedinjuje: T - karakteristike primarnog tumora (dimenzije i/ili lokalnu raširenost), N – prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima i M – prisustvo udaljenih metastaza (17).

Odgovor imunog sistema na prisustvo tumorskih ćelija se ogleda kroz infiltraciju tumora imunološkim ćelijama, u prvom redu stromalnim limfocitima (sTIL), među kojima dominantnu populaciju čine T-limfociti. Smatra se da ključnu ulogu u antitumorskom imunološkom odgovoru imaju citotoksični (CD8) T-limfociti koji, nakon aktivacije od strane CD4 „helper“ T-limfocita, direktno eliminišu tumorske ćelije preko ekspresije Fas liganda na svojoj površini ili oslobađanjem potentnih citotoksina. Međutim, „helper“ limfociti imaju mnogo kompleksniju ulogu u medijaciji antitumorskog imunološkog odgovora jer se, u zavisnosti od predominantnih

citokina sekretovanih u tumorskoj mikrookolini, mogu diferencirati u različite podtipove efektorskih ćelija sa potpuno oprečnim ulogama u ovom procesu. (18)

Procjena sTIL na hematoksilin-eozin bojenim preparatima može predstavljati sastavni dio patohistološke analize karcinoma dojke (19). Naime, veća gustina sTIL, kao i prisustvo peritumorskih limfoidnih agregata (8), smatraju se indikatorima povoljnog odgovora na hemioterapiju i generalno bolje prognoze, naročito kada su u pitanju trostruko-negativni (TNBC) i neluminalni HER-2 pozitivni karcinomi dojke (19,20). Upravo su karcinomi dojke ova dva podtipa, u različitim studijama, upotrebom različitih metoda, identifikovani kao tumori koji češće pokazuju visoku ekspresiju PD-L1 proteina u odnosu na luminalne molekularne podtipove (8). Evaluacija ekspresije PD-L1 u tumorskom tkivu se najčešće vrši mikroskopskom analizom imunohistohemijski bojenih isječaka tumora. U zavisnosti od primijenjenog antitijela, ekspresija se kvantifikuje kao procenat tumorskih ili imunoloških ćelija u tumorskoj mikrookolini koje pokazuju parcijalno ili kompletno membransko, odnosno membransko ili citoplazmatsko bojenje bilo kog intenziteta (21).

Rezultati dosadašnjih studija na karcinomu dojke su ukazali na postojanje povezanosti između PD-L1 ekspresije i negativnih prognostičkih parametara (poput većih dimenzija, višeg gradusa i proliferativne aktivnosti tumora, odsustva ekspresije steroidnih receptora) (10). Međutim, pokazana je i visoko značajna asocijacija između ekspresije PD-L1 i velike gustine TIL, koji predstavlja nezavisan povoljan prognostički faktor u karcinomu dojke (10). Takođe, objavljen je veliki broj studija sa prilično kontradiktornim rezultatima kada je u pitanju prognostički značaj ekspresije PD-L1 u karcinomu dojke (7,10,22), kao i njegoa prediktivna vrijednost u selekciji kandidata za terapiju inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka (7). Mada primjena različite metodologije za evaluaciju ekspresije ovog markera značajno otežava komparabilnost rezultata ovih studija (7), pojedini autori smatraju da je, upravo zbog heterogenosti karcinoma dojke, procjena ekspresije PD-L1 unutar samo jedne ćelijske populacije insuficijentan marker (7,8), odnosno da je dijagnostička informacija potpunija ukoliko se ekspresija paralelno procjenjuje i u tumorskim ćelijama i u ćelijama tumorske mikrookoline (8).

Naime, povećana ekspresija PD-L1 na površini tumorskih ćelija može biti konstitutivna – kao posljedica onkogene mutacije, ili inducibilna – kao odgovor na prisustvo interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) produkcijskih T-limfocita u tumorskoj mikrookolini (6). Pojedini autori su ukazali na mogućnost razlikovanja ova dva obrasca prekomjerne ekspresije PD-L1 na osnovu rezultata imunohistohemijskog bojenja. Tako bi intenzivno i homogeno bojenje u gotovo svim tumorskim ćelijama ukazivalo na konstitutivnu ekspresiju, dok bi mrljasto bojenje tumorskih ćelija ograničeno na invazivni front i neposrednu blizinu stromalnih inflamatornih ćelija, koje se i same često boje mnogo intenzivnije od tumorskih, ukazivalo na inducibilnu ekspresiju PD-L1 proteina (6). U skladu sa osnovnim principima onkogeneze, različiti obrasci PD-L1 ekspresije bi mogli imati različite efekte na biološko ponašanje tumora, ali i različitu vrijednost kao prediktivni markeri u selekciji pacijentkinja koje bi eventualno imale korist od terapije inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka (6). Osim toga, pojedini autori su mišljenja da bi i sastav intratumorskog inflamatornog infiltrata mogao biti od značaja prilikom selekcije pacijentkinja za ovaj vid ciljne terapije (23), što podržavaju brojne studije čiji su rezultati doveli u vezu dominaciju CD4 T-limfocita i visok CD4/CD8 odnos u upalnom infiltratu sa nepovoljnim ishodom kod karcinoma dojke (24).

Sve ovo govori u prilog značaja procjene PD-L1 ekspresije u tumorskim i imunološkim ćelijama, sa posebnim osvrtom na gustinu i karakteristike intratumorskog inflamatornog infiltrata (6), sa ciljem njegove optimizacije kao biomarkera u kliničkoj primjeni. Međutim, podaci o povezanosti PD-L1 ekspresije i karakteristika intratumorskog upalnog infiltrata su veoma ograničeni u dostupnoj literaturi, naročito kada je u pitanju rani karcinom dojke (10).

<b>Cilj i hipoteze</b>
<p>Ciljevi doktorskog istraživanja su:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Utvrditi obrasce ekspresije PD-L1 proteina u tumorskim ćelijama (konstitutivna/inducibilna) različitih molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke.</li><li>2. Ispitati postojanje razlika u obrascu PD-L1 ekspresije (tumorske i imunološke ćelije) između molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke.</li><li>3. Ispitati povezanost različitih obrazaca PD-L1 ekspresije sa gustinom sTIL i prisustvom CD4+ i CD8+ tumor-infiltrirajućih limfocita u ranom karcinomu dojke.</li><li>4. Ispitati povezanost različitih obrazaca PD-L1 ekspresije sa patološkim prognostičkim parametrima (veličinom i histološkim gradusom tumora, Ki67 indeksom proliferacije i statusom steroidnih receptora i HER2 i patološkim TNM stadijumom) kod ranog karcinoma dojke.</li></ol> <p>Na osnovu navedenih ciljeva, postavljene su sljedeće hipoteze:</p> <p>H1: Postoje razlike u obrascima PD-L1 ekspresije u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke.</p> <p>H2: PD-L1 se češće eksprimira u karcinomima dojke sa većom gustinom sTIL.</p> <p>H3: Različiti obrasci PD-L1 ekspresije povezani su sa različitom gustinom i sastavom sTIL (CD4 i CD8 T limfocita) u ranom karcinomu dojke.</p> <p>H4: Obrasci PD-L1 ekspresije pokazuju razlike u odnosu na patološke prognostičke parametre (veličinu i histološki gradus tumora, status steroidnih receptora, Ki67 indeks proliferacije, status HER2 receptora, TNM stadijum i molekularni podtip) u ranom karcinomu dojke.</p>
<b>Materijali, metode i plan istraživanja</b>
<b>Materijali i metode</b>
<p><b>Uzorak:</b></p> <p>Planirano istraživanje je dizajnirano kao retrospektivna deskriptivna studija, koja će obuhvatiti sve pacijentkinje kojima je u Centru za patologiju Kliničkog centra Crne Gore, u periodu od 01.01.2016. do 31.12.2021. godine, na operativnom materijalu dijagnostikovan invazivni karcinom dojke stadijuma IA-IIIa (prema osmom izdanju TNM klasifikacije), sa poznatim statusom HER-2, estrogenskih i progesteronskih receptora (ER i PR), kao i vrijednošću Ki67 indeksa proliferacije, a koje nijesu prethodno primale neoadjuvantnu terapiju i kod kojih u dostupnim arhiviranim parafinskim kalupima ima dovoljno materijala za planiranu dalju imunohistohemijsku analizu.</p> <p>Pored patohistoloških nalaza iz arhive Centra za patologiju, kao izvor podataka biće korišćena i medicinska dokumentacija Instituta za onkologiju Kliničkog centra Crne Gore.</p> <p>Pregledom patohistoloških izvještaja sa podacima o stepenu imunohistohemijske ekspresije ER i PR, HER-2 statusu i Ki67 indeksu proliferacije, a prema St. Gallen konsenzusu (2), biće određena pripadnost tumora jednom od pet imunofenotipova (Luminal A, Luminal B HER-2 pozitivni, Luminal B HER-2 negativni, neluminalni HER-2 pozitivni i trostruko-negativni), na osnovu čega će pacijentkinje biti razvrstane u pet grupa. Uzorak će biti formiran tako da se unutar svake od navedenih grupa nalazi jednak broj pacijentkinja, sa istom prosječnom starošću.</p>
<p><b>Analiza HE bojenih histoloških preparata:</b></p> <p>Pregledom arhiviranih mikroskopskih pločica bojenih tehnikom hematoksilin-cozin biće potvrđen histološki tip i gradus tumora, kvantifikovano prisustvo sTIL (kao procenat tumorske strome prekrivene limfocitima) i evidentirano prisustvo peritumorskih limfoidnih agregata. Po uzoru na metodologiju Cimino-Mathews i saradnika (8), stromalni limfocitni infiltrat (sTIL) će</p>

biti skorovan kao: odsutan, oskudan (<5% strome tumora), umjeren (fokalan infiltrat u 5-50% strome tumora) i gust (difuzan infiltrat u  $\geq 50\%$  strome tumora), a peritumorski limfoidni agregati kao: odsutni, fokalni (rijetke izolovane nakupine limfoidnih ćelija), umjereno razvijeni (multipli limfoidni agregati) i dobro razvijeni (multipli agregati sa dobro razvijenim germinativnim centrima).

#### **Formiranje tkivnih mikroisječaka (TMA)**

Za svaku od pacijentkinja, sa invazivnog fronta tumora, iz arhiviranih parafinskih kalupa će biti formirana po dva tkivna mikroisječka promjera 3 mm, upotrebom Quick Ray Manual Tissue Microarrayer seta. Dobijeni preparati će najprije biti bojeni standardnom HE tehnikom, kako bi se potvrdila adekvatnost uzorka i olakšala orijentacija prilikom interpretacije imunohistohemijskih bojenja.

#### **Imunohistohemija:**

Dobijeni TMA će biti bojeni imunohistohemijski upotrebom CD4 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD4, Clone 4B12, DAKO) i CD8 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, T-cell, Clone C8/144B, DAKO) antitijela na DAKO Autostainer Link 48 platformi i PD-L1 (Monoclonal Rabbit Anti-Human PD-L1, Clone SP142, Roche/Ventana medical systems) antitijelom na Ventana Benchmark Ultra automatizovanoj platformi, prema uputstvima proizvođača. Kao spoljašnja pozitivna kontrola imunohistohemijskog bojenja biće korišćeno tkivo tonzile.

Broj CD4 i CD8 pozitivnih sTIL po mm<sup>2</sup> će biti izračunat kao srednja vrijednost nakon brojanja navedenih ćelija u oba mikroisječka svakog pojedinačnog tumora i dobijene vrijednosti će biti korišćene za izračunavanje CD4/CD8 odnosa.

Prilikom kvantifikacije PD-L1 ekspresije u tumorskim i imunološkim ćelijama u obzir će se uzeti one ćelije koje pokazuju parcijalno ili kompletno membransko, odnosno membransko ili citoplazmatsko bojenje bilo kog intenziteta. Ekspresija PD-L1 u tumorskim ćelijama će biti kvantifikovana primjenom TPS algoritma skorovanja (tumor proportion score - odnos broja PD-L1 pozitivnih tumorskih ćelija prema ukupnom broju vitalnih tumorskih ćelija, pomnožen sa 100%), dok će za kvantifikaciju ekspresije u imunološkim ćelijama biti korišćen ICS algoritam (immune cell score - procenat svih PD-L1 pozitivnih imunih ćelija u ukupnoj površini koju zauzima tumor). (7) Krajnji rezultat će predstavljati srednja vrijednost TPS i ICS očitanih sa oba mikrorreza svakog pojedinačnog tumora. Prema trenutno važećem protokolu za procjenu PD-L1 ekspresije u metastatskom TNBC, pozitivnim nalazom u imunološkim ćelijama će se smatrati ICS  $\geq 1\%$  (7), dok će TPS  $\geq 1\%$  označavati pozitivnu PD-L1 ekspresiju u tumorskim ćelijama.

#### **Statistička analiza:**

Za određivanje značajnosti razlike kvantitativnih varijabli (starosna dob - u godinama; veličina tumora - u mm; Ki67 proliferativni indeks - u procentima; broj CD4 i CD8 pozitivnih sTIL i CD4/CD8 odnos) u odnosu na obrazac ekspresije PD-L1 proteina biće korišćen t-test, dok će za određivanje značajnosti razlike kvalitativnih varijabli (gradus, gustina sTIL i peritumorskih limfoidnih agregata, imunofenotip, status hormonskih receptora i HER-2) u odnosu na ekspresiju PD-L1 proteina biti korišćen hi-kvadrat test.

Za ispitivanje povezanosti svih pomenutih varijabli sa ekspresijom PD-L1 biće korišćena metoda logističke regresije.

Zaključivanje o statističkim hipotezama u ovom radu sprovedeće se uz nivo značajnosti  $p \leq 0.05$ .

#### **Očekivani naučni doprinos**

S obzirom na epidemiološki značaj karcinoma dojke u ženskom dijelu populacije, kao i prepoznatu ulogu imunog sistema u progresiji malignih tumora, predloženo istraživanje će doprinijeti boljem razumijevanju ekspresije konstituenata imunološkog odgovora kao što je PD-L1 protein, prisustvo tumor infiltrirajućih limfocita, te CD4 i CD8 T- limfocita u tumorskom tkivu.

Rasvjetljavanjem povezanosti obrasca PD-L1 ekspresije sa gustinom i sastavom intratumorskog limfocitnog infiltrata u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke, želimo dati svoj doprinos trenutno insuficijentnoj naučnoj literaturi, ali i procesu optimizacije upotrebe PD-L1 kao prognostičkog i prediktivnog biomarkera u karcinomu dojke.

#### Spisak objavljenih radova kandidata

- Vučković L, Klisic A, Raonić J, **Vučinić, J.** Comparative study of immunohistochemical determination of breast cancer molecular subtypes on core biopsy and surgical specimens. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021 Jun;25:3990-3996.
- Restović I, Bočina I, Vukojević K, Kero D, Raonić J, **Vučinić J,** et al. Time course and expression pattern of the neuronal markers in the developing human spinal cord. *Int J Dev Neurosci.* 2019 Feb;74:1-10.
- Radnić B, Radojević N, **Vucinić J,** Duborija-Kovacević N. The association between pro-arrhythmic agents and aortic stenosis in young adults: is it sufficient to clarify the sudden unexpected deaths? *Cardiol Young.* 2017 Jul;27(5):929-935.
- Radojević N, Radnić B, **Vucinić J,** Cukić D, Lazović R, Asanin B, Savić S. Mathematical model in post-mortem estimation of brain edema using morphometric parameters. *J Forensic Leg Med.* 2017 Jan;45:21-28.
- Radunović M, Radojević N, Rakočević V, **Vučinić J,** Čurović I. Clinical and autopsy findings of the homeless. *Srp Arh Celok Lek.* 2017 Mar;145(9-10):508-512.

#### Popis literature

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 Feb;71(3):209-249.
2. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019 Aug;30(8):1194-1220.
3. Planes-Laine G, Rochigneux P, Bertucci F, Chrétien AS, Viens P, Sabatier R, et al. PD-1/PD-L1 targeting in breast cancer: the first clinical evidences are emerging—a literature review. *Cancers.* 2019 Jul;11(7):1033.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar;144(5):646-674.
5. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1: PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. *Front Immunol.* 2016 Dec;7:550.
6. Ribas A, Hu-Lieskovan S. What does PD-L1 positive or negative mean? *J Exp Med.* 2016 Nov;213(13):2835-2840.
7. Stovgaard ES, Dyhl-Polk A, Roslind A, Balslev E, Nielsen D. PD-L1 expression in breast cancer: expression in subtypes and prognostic significance: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Jan;174(3):571-584.

8. Cimino-Mathews A, Thompson E, Taube JM, Ye X, Lu Y, Meeker A, et al. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Hum Pathol.* 2016 Jan;47(1):52-63.

9. Erber R, Hartmann A. Understanding PD-L1 Testing in Breast Cancer: A Practical Approach. *Breast Care.* 2020 Oct;15(5):1-10.

10. Kitano A, Ono M, Yoshida M, Noguchi E, Shimomura A, Shimoi T, et al. K. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO open.* 2017 May;2(2):e000150.

11. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(21):9543-9553.

12. Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Konishi I. Dual faces of IFN $\gamma$  in cancer progression: a role of PD-L1 induction in the determination of pro-and antitumor immunity. *Clin Cancer Res.* 2016 May;22(10):2329-2334.

13. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Dec;56(8):1173-1182.

14. Hino R, Kabashima K, Kato YU, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer.* 2010 Apr;116(7):1757-1766.

15. Anagnostou VK, Brahmer JR. Cancer immunotherapy: a future paradigm shift in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2015 Mar;21(5):976-984.

16. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000 Aug;406(6797):747-752.

17. Hayes DF, Isaacs C, Stearns V. Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2001 Oct;6(4):375-392.

18. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M., Kühnel F, Woller N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Oct;75(4):689-713.

19. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jan;28(1):105-113.

20. Gao G, Wang Z, Qu X, Zhang Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC cancer.* 2020 Mar;20(1):1-

21. Peg V, López-García MÁ, Comerma L, Peiro G, Garcia-Caballero T, Lopez AC, Rojo F. PD-L1 testing based on the SP142 antibody in metastatic triple-negative breast cancer: summary of an expert round-table discussion. *Future Oncol.* 2020 Dec;17(10):1209-1218.


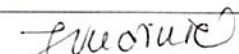
22. Muenst S, Schaerli AR, Gao F, Däster S, Trella E, Drosner RA, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 May;146(1):15-24.

23. Gisterek I, Frydecka I, Świątoniowski G, Fidler S, Kornafel J. Tumour-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2008 Jul;13(4):206-209.

24. Huang Y, Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, Peng G. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget.* 2015 Jul;6(19):17462.

**SAGLASNOST PREDLOŽENOG/IH MENTORA I DOKTORANDA SA PRIJAVOM**

Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje.

Prvi mentor	Prof. dr Ljiljana Vučković	
Drugi mentor		
Doktorand	Mr sci. Jelena Vučinić	

**IZJAVA**

Odgovorno izjavljujem da doktorsku disertaciju sa istom temom nisam prijavio/la ni na jednom drugom fakultetu.

U Podgorici,  
13.01.2022. godine

Ime i prezime doktoranda  
Jelena Vučur