

**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
E-mail: infomedf@ac.me



**MEDICAL
FACULTY**

Address: Krusevac bb
81000 PODGORICA
MONTENEGRO
Phone: +382 20 246 651
Fax: +382 20 243 842
url: www.ucg.ac.me/medf
E-mail: infomedf@ac.me

Broj: 576/5-1
Podgorica, 21.04.2023. godine

**Univerzitet Crne Gore
Odbor za doktorske studije
n/r predsjedniku – prof. dr Borisu Vukićeviću**

Poštovani,

U skladu sa stavom 3 člana 35 i tačkom 3.6. Vodiča za doktorske studije, dostavljamo Odluku Vijeća Medicinskog fakulteta o usvajanju Izvještaja Komisije za ocjenu prijave doktorske disertacije (obrazac D1) i prijavu teme doktorske disertacije, doktoranda dr med Branka Čampara.

S poštovanjem,

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



UNIVERZITET CRNE GORE
MEDICINSKI FAKULTET
Broj: 576/5
Podgorica, 19.04.2023. godine

Na osnovu člana 64 stav 2 tačka 9 Statuta Univerziteta Crne Gore, a u skladu sa članom 35 Pravila doktorskih studija (Bilten UCG broj: 513/20 i 561/22), Vijeće Medicinskog fakulteta na sjednici održanoj 19.04.2023. godine donijelo je

ODLUKU

1. Usvaja se Izvještaj Komisije za ocjenu prijave doktorske disertacije kandidata dr med Branka Čampara, broj: 472 od 20.03.2023. godine.
2. Predlaže se Senatu UCG da prihvati kao podobnu doktorsku tezu pod nazivom „**Kliničko-patološke karakteristike adenokarcinoma pluća sa BRAF V600E mutacijom**“ kandidata dr med Branka Čampara.
3. Odluka Vijeća, Izvještaj Komisije iz tačke 1 ove odluke i obrazac Prijave teme doktorske disertacije (obrazac PD broj: 1805 od 31.10.2022. godine), dostavlja se Centru za doktorske studije i Senatu Univerziteta Crne Gore, na dalju realizaciju.

OBRAZLOŽENJE

Dr med Branko Čampar podnio je prijavu teme doktorske disertacije pod nazivom „**Kliničko-patološke karakteristike adenokarcinoma pluća sa BRAF V600E mutacijom**“ dana 31.10.2022. godine (Broj prijave: 1805).

Vijeće Medicinskog fakulteta na sjednici održanoj 21.02.2023. godine imenovalo je Komisiju za ocjenu prijave doktorske disertacije, kandidata dr med Branka Čampara u sastavu: prof. dr Miodrag Radunović, prof. dr Milana Panjković i prof. dr Mileta Golubović.

Kandidat je pred navedenom Komisijom javno obrazložio ciljeve i očekivane rezultate, odnosno izložio istraživački program doktorske teze, dana 10.03.2023. godine. Komisija je podnijela Vijeću Medicinskog fakulteta Izvještaj o ocjeni podobnosti doktorske disertacije broj:472 od 20.03.2023. godine.

Vijeće Medicinskog fakulteta na sjednici održanoj 19.04.2023. godine, nakon razmatranja izvještaja Komisije broj: 472 od 20.03.2023. godine, odlučilo je kao u dispozitivu ove odluke.

VIJEĆE MEDICINSKOG FAKULTETA
PREDSJEDAVAJUĆI,
Prof. dr Miodrag Radunović, dekan





OCJENA PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Dr med Branko Čampar
Fakultet	Medicinski Fakultet u Podgorici
Studijski program	Doktorske studije- Medicina
Broj indeksa	17/09
Podaci o magistarskom radu	(naziv, naučna oblast, institucija na kojoj su završene magistarske studije, godina završetka, srednja ocjena)
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Službeni jezik	KLINIČKO-PATOLOŠKE KARAKTERISTIKE ADENOKARCINOMA PLUĆA SA BRAF V600E MUTACIJOM
Engleski jezik	CLINICAL AND PATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ADENOCARCINOMA OF THE LUNG WITH BRAF V600E MUTATION
Datum prihvatanja teme i kandidata na sjednici Vijeća fakulteta	19.04.2023.
Naučna oblast doktorske disertacije	Klinička patologija
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 "Kliničko - patološke karakteristike adenokarcinoma pluća sa BRAF V600E mutacijom" kandidata dr med Branka Čampara, održana je 10.03.2023. godine sa početkom u 11 časova , u Sali za sastanke dekanata Medicinskog fakulteta, pred Komisijom u sastavu:</p> <ol style="list-style-type: none">1. prof.dr Miodrag Radunović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, predsjednik2. Prof.dr Milana Panjković, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nvom Sadu, mentor-član3. Prof. Dr Mileta Golubović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, član <p>Uvodnu riječ imao je predsjednik Komisije, prof dr Miodrag Radunović, koji je saopštio biografske i druge relevantne podatke iz priložene dokumentacije, nakon čega je kandidat u petnaestominutnom izlaganju izneo istraživački program doktorske disertacije.</p> <p>U uvodnom dijelu izlaganja, kandidat je dao obrazloženje predložene teme, sa najvažnijim do sada ostvarenim rezultatima u oblasti istraživanja. Nakon toga , kandidat je upoznao Komisiju sa planiranim pravcem istraživanja, izložio ciljeve i hipoteze i objasnio metodološki pristup predloženog istraživanja. U zaključku, kandidat je izneo dokaze za originalnost i očekivani naučni doprinos istraživanja.</p> <p>Nakon saslušanog izlaganja kandidata, članovi komisije za ocijenu teme su dali komentare i sugestije za nastavak rada i postavili pitanja na koja je kandidat uspješno odgovorio(prilog).</p>	

Komisija je nakon sprovedenog postupka jednoglasno donijela odluku da je kandidat dr med Branko Čampar sa uspjehom odbranio istraživački program doktorske disertacije.

B. OCJENA PODOBNOSTI TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

B1. Obrazloženje teme

Karcinom pluća sa prosečno 2.2 miliona slučajeva i 1.8 miliona smrtnih slučajeva je drugi najčešće dijagnostikovani karcinom i vodeći uzrok smrtnosti od karcinoma u 2020 godini (1). Procenjeno je bilo da će 2021. godine u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) biti 235.760 novih slučajeva karcinoma pluća od čega će 131.880 ljudi umrjeti od ove bolesti (2). Nesitnoćelijski karcinomi pluća (NSCLC) čine 85% svih karcinoma pluća od kojih su najčešći adenokarcinom (44%) i skvamozni karcinom (26%). Incidenca karcinoma pluća je 1.5 puta veća kod muškaraca u odnosu na žene (3). Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa karcinomom pluća je između 10-20% u većini zemalja, sa najvećom stopom u Japanu (33%) (1). Zbog niske stope petogodišnjeg preživljavanja cilj je pronaći nove terapijske modalitete, pre svega ciljane molekularne terapije. Napredak u lečenju NSCLC zasnovan je na razumevanju njegovih histoloških i molekularnih karakteristika koje dovode do razvoja novih ciljanih molekularnih terapija (4). Objavljen je mali broj studija koje analiziraju učestalost IHC ekspresije i mutacije BRAF V600E gena kod adenokarcinoma pluća. Ovo je brz, specifičan i veoma senzitivnan metod koji vodi ka naprednom stejdzingu pozitivnog tumora za liječenje BRAF inhibitorima. Analiza molekularnih puteva je ključ za bolje razumevanje karcinoma pluća. Postoje najmanje 2 molekularna puta u karcinogenezi pluća. Jedan je povezan sa pušenjem i aktiviranjem Kirsten rat sarkoma virusa (KRAS-a), a drugi se javlja kod nepušača i ima aktivaciju sa receptorom epidermalnog faktora rasta (EGFR) (5). Najčešća genetska alteracija kod NSCLC je povezana sa mutacijom EGFR gena. Ova mutacija je prisutna u oko 10-13% pacijenata bele rase i ima ulogu u ranoj fazi tumorske inicijacije što predstavlja potencijalnu metu za ciljanu terapiju (6). Druge važne mutacije su povezane sa anaplastik limfoma kinaza genom preuređenja (ALK) i c-ros onkogenom 1 (ROS1). Kod karcinoma pluća su otkrivene mutacije i HER2 (humani epidermalni faktor rasta 2), MET (faktor rasta hepatocita) i RET (preuređenja tokom transfekcije) gena, a nedavno dodatnim molekularnim ispitivanjima indentifikovane su i mutacije v-raf mišjeg sarkoma onkogene homologa B (BRAF) i mutacije u genu neurotrofične tropomiozin receptor kinaze (NTRK). Sve ove mutacije se potencijalno mogu lečiti (7). BRAF protoonkogen je član RAF familije serin/treonin kinaze, uključujući izoforme, v-RAF mišiji sarkom virusa onkogene homologa A (ARAF). Onkogene mutacije RAS-a i BRAF-a obično su međusobno isključujući događaji. BRAF je mutiran u 8% od svih humanih karcinoma, predominantno u leukemiji vlasastih ćelija (100%), melanomu (>60%), kolorektalnom karcinomu (10%), i rede u karcinomu pluća i jajnika. BRAF mutacije otkrivene su u 2-4 % karcinoma pluća, što je manje od učestalosti mutacija EGFR-a (10-15%) i neznatno manje od mutacije humanog anaplastičnog limfoma tirozin kinaze (ALK) koja se javlja u 3-5% slučajeva (8). Gotovo sve BRAF mutacije indentifikovane su u egzonu 11 i 15. Tačkasta mutacija u egzonu 15 BRAF gena rezultira supstitucijom valina i glutamata kodona 600 (V 600) koji utiče na kinazni domen BRAF proteina (9). Ova promena dovodi do konstitutivne aktivacije B-raf kinaze i naknadne transdukcije signala do mitogen-aktivirane protein kinaze kaskade (MAPK), ekstracelularne signalno regulisane kinaze (EPK), što rezultira 10-strukim povećanjem aktivnosti BRAF-a u odnosu na aktivnost u divljem tipu proteina (WT) (10). Mutacija BRAF V600E indukuje samoodrživu konstantnu aktivaciju MAPK/ERK puta, čime se inhibira kontrolisana ćelijska smrt apoptozom posrednom regulacijom bcl-2 antagonist ćelijske smrti (BAD). Put BRAF V600E drastično povećava bazalne nivoe proliferacije, u skladu sa onkogenim razvojem. Zbog toga bi mutacija BRAF V600E mogla biti ciljana za lečenje specifičnim inhibitorima koji bi doveli do povećanja apoptotičke aktivnosti (11). Metode koje se koriste za detekciju BRAF V600E su imunohistohemija (IHC) sa korišćenjem VE1 antitela i lančana reakcija polimeraze (PCR). Vemurafenib i Darbafenib su

inhibitori serin/treonin kinaze BRAF tipa, koji imaju veću selektivnost za mutirani protein BRAF V600E od BRAF WT, koji nema aktivnost protiv drugih humanih kinaza.(12)

B2. Cilj i hipoteze

Ciljevi dokorskog istraživanja su:

1. Utvrditi učestalost IHC ekspresije BRAF V600E u adenokarcinomu pluća.
2. Utvrditi učestalost mutacije BRAF V600E gena.
3. Uporediti dobijene rezultate IHC ekspresije BRAF V600E sa dobijenim rezultatima mutacije BRAFV600E gena.
4. Uporediti učestalost pozitivne IHC ekspresije BRAF V600E i prisutne BRAF mutacije kod različitih histoloških podtipova adenokarcinoma pluća (acinarni, papilarni, lepidični, mikropapilarni, solidnim i drugim varijantama adenokarcinoma) na osnovu nove klasifikacije SZO (13).
5. Utvrditi da li je pozitivna IHC ekspresija BRAF V600E i prisutna mutacija BRAF gena povezana sa demografskim parametrima, pušačkim statusom, pojavom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima ili udaljenim organima, infiltracijom pleure i okolnih struktura, odnosno stadijumom bolesti.

Na osnovu navedenih ciljeva, postavljene su sledeće hipoteze:

- H1. Pozitivna IHC ekspresija BRAF V600E u adenokarcinomu pluća je veća od 1,5 %.
- H2. Učestalost mutacije BRAF V600E gena je veća od 1,5%.
- H3. Dobijeni rezultati pozitivne IHC ekspresije BRAF V600E sa dobijenim rezultatima prisutne mutacije BRAF V600E gena slažu se u više od 80%.
- H4. Pozitivna IHC ekspresija i prisutna BRAF V600E mutacija češći su kod acinarnih, solidnih i mikropapilarnih adenokarcinoma pluća u odnosu na druge histološke tipove.
- H 5. Pozitivna IHC ekspresija i prisutna BRAF V600E mutacija je češća kod žena i nepušača, sa infiltracijom pleure i okolnih struktura, i sa većim stadijumom bolesti.

B3. Metode i plan istraživanja

Uzorak

Uzorkovanje bi se izvršilo prostom randomizacijom pacijenta operisanih zbog adenokarcinoma pluća u vremenskom periodu od januara 2016 do decembra 2022. godine. U ovom istraživanju bi se koristio operativni materijal koji je ukalupljen u parafinske blokove i arhiviran u centru za patologiju KCCG. Podaci za sve pacijente biće dobijeni iz istorija bolesti, onkoloških kartona i patohistoloških nalaza. Kriterijumi za isključenje iz studije biće eventualni nedostatak podataka iz medicinske dokumentacije i materijal neadekvatan za analizu. Pacijenti kod kojih bude nađena pozitivna IHC ekspresija BRAF V600E će biti testirani PCR-om na BRAF mutaciju.

Istraživanje retrospektivno-prospektivnog karaktera biće sprovedeno u Centru za patologiju Kliničkog Centra Crne Gore (KCCG). Studija će obuhvatiti pacijente KCCG koji su operisani u periodu od januara 2016. do decembra 2022. godine i kod kojih je na operativnom materijalu patohistološki dokazan invazivni adenokarcinom pluća. U retrospektivnom delu studije pločice i kalupi iz arhive Centra za patologiju ponovo će biti patohistološki analizirani. Deo iz očuvanog,

vitalnog dela tumorskog tkiva biće označen na pločici i kalupu i taj deo će se podvrgnuti imunohistohemijskom bojenju BRAF V600E (VE1) antitelom i molekularnom PCR testiranju BRAF V600E mutacije. U prospektivnom delu studije, uzorci tkiva pluća dobijeni operativnim putem biće fiksirani u 10% neutralnom formalinu i nakon kalupljenja u parafinu sečeni mikrotomom na tkivne isečke debljine 4 mikrona, a potom deparafinisani i bojeni Hematoxylin-Eosin (HE) metodom i mikroskopski analizirani. Deo vitalnog tumorskog tkiva biće označen na pločici i kalupu i taj deo tkiva će se podvrgnuti imunohistohemijskom bojenju BRAF V600E (VE1) antitelom i molekularnom PCR testiranju BRAF V600E mutacije. Izvođenje metode: Uzorci tumorskog tkiva pacijenata bojiće se IHC korišćenjem primarnog mišijeg monoklalnog antitela, BRAF V600E (VE1) u BenchMark®XT aparatu (Ventana Medical Systems) sa ćelijskim kondicionerom 1 (CC1) tokom 64 min, pre-peroksidaza inhibicijom i inkubacijom primarnog antitela 16 min na 37 ° C. Konačna koncentracija antitela će biti ~ 12 mg/ml. Opti View DAB IHC komplet za otkrivanje će biti korišćen za detekciju ekspresije BRAF V600E proteina. Tkiva će biti obojena hematoksilinom II i Bluing reagensom u trajanju od 4 min. Za merenje nespecifičnog pozadinskog signala, svako tkivo će biti obojeno mišijim monoklonskim antitelom (MOPC-21). Kao pozitivna i negativna kontrola koristiće se uzorci tkiva metastatskog melanoma koji su ranije višestruko testirani i kod kojih je imunohistohemijska ekspresija BRAF V600E (VE1) bila pozitivna ocenjena sa 3+ i negativna ocenjena sa 0. Za interpretaciju imunohistohemijske ekspresije BRAF V600E antitela koristiće se obrazac prema preporukama (Sasaki et al, 2013.) za određivanje IHC BRAF V600E ekspresije kod adenokarcinoma pluća. Tumor će se smatrati pozitivnim ako u više od 50% tumorskih ćelija postoji nedvosmisleno, uniformno citoplazmatsko bojenje, a intezitet bojenja ocenjivaće se sa: 0 (negativno), 1+ (slabo citoplazmatsko bojenje), 2+ (umereno citoplazmatsko bojenje) i 3+ (jako citoplazmatsko bojenje) (14). Tumori koji su IHC ocenjeni sa 1+, 2+ i 3+ biće označeni kao pozitivni i ti uzorci će biti podvrgnuti PCR testiranju BRAF V600E mutacije. Kao kontrolna grupa uzeće se isti broj negativno IHC ocenjenih sa 0 uzoraka tumora i ti uzorci će se PCR testirati na BRAFV600E mutaciju. BRAF V600E Sanger sekvencioniranje će se izvoditi ekstrahovanjem genomske DNK iz isečaka debljine 20 mikrona. Prajmeri za Sanger sekvencioniranje će pojačati region egzona 15 BRAF gena koji kodira sekvence na mestu mutacije i nekoliko nukleotida u intronu na oba kraja. Koristiće se dva prajmera: 1) BRAF-ex15FTGCTTGCTCTGATAGGAAAATG i 2) BRAF-ex15RAGCATCTCAGGGCCAAAAT. Lanci će biti sekvencionirani u oba pravca na Applied Biosystem's 3730xl DNA Analyzer-u i analizirani pomoću DNASTAR Lasergene 12 software (DNASTAR, Madison, WI). U odnosu na IHC ekspresiju BRAF V600E (VE1) pacijenti će biti podeljeni u dve grupe: grupa pacijenata sa pozitivnom ekspresijom (ocenjeni sa 1+, 2+ i 3+) i grupa pacijenata sa negativnom ekspresijom (ocenjeni sa 0). Grupe će se upoređivati u odnosu na demografske parametre, pušački status, prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, udaljenim organima, infiltracijom pleure i okolnih struktura, odnosno sa stadijumom bolesti. Upoređivaće se učestalost kod različitih histoloških podtipova adenokarcinoma pluća (acinarni, papilarni, lepidični, mikropapilarni, solidnim i drugim varijantama adenokarcinoma) na osnovu nove klasifikacije SZO (13). U odnosu na mutaciju BRAF V600E gena pacijenti će biti podeljeni u dve grupe: grupa pacijenata sa prisutnom BRAF V600E mutacijom i grupa pacijenata sa odsutnom BRAF V600E mutacijom. Grupe će se upoređivati u odnosu na demografske parametre, pušački status, prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, udaljenim organima, infiltracijom pleure i okolnih struktura, odnosno sa stadijumom bolesti. Grupe će se upoređivati u odnosu na učestalost kod različitih histoloških podtipova adenokarcinoma pluća (acinarni, papilarni, lepidični, mikropapilarni, solidnim i drugim varijantama adenokarcinoma) na osnovu nove klasifikacije SZO. Evaluacija imunohistohemijske ekspresije i mutacije BRAF V600E će biti izvršena od strane dva posmatrača. U slučajevima gde bude postojalo neslaganje tražiće se

mišljenje i trećeg, supervizora, koji se u svakodnevnom radu bavi dominantno plućnom patologijom sa najdužim stažom u ovoj oblasti.

NEZAVISNE VARIJABLE (Uzrok)

-Demografske karakteristike pacijenata (starost i pol)

-Pušački status

-Veličina tumora

-Tip adenokarcinoma

-Infiltracija pleure i medijastinalnih struktura

-Prisustvo metastaza u limfnim čvorovima

-Prisustvo udaljenih metastaza

-Patohistološki stadijum bolesti (pTNM)

-Klinički stadijum bolesti

ZAVISNE VARIJABLE (Ishod)

-Ekspresija BRAF V600E proteina

-Mutacija BRAF V600E gena

SNAGA ISTRAŽIVANJA I VELIČINA UZORKA

Veličina uzorka je izračunata na osnovu podataka o ekspresiji BRAFV600E u adenokarcinomima pluća, a ovi podaci su dobijeni iz studije Hofman i saradnika (15). Prema podacima iz literature oko 3% adenokarcinoma pluća ima pozitivnu ekspresiju BRAF V600E, od kojih je oko 83% slučajeva imalo PCR potvrđenu BRAFV 600E mutaciju. Opravdanost broja ispitanika potrebnih za studiju je računat koristeći program G*Power 3.1.9.7 i a priori analizu za ch2 test (tabele kontigencije) gde je stepen slobode $Df = (\text{broj reda} - 1) \times (\text{broj kolone} - 1) = 15$. Ulazni parametri su bili sledeći: veličina efekta je iznosila 0,4; verovatnoća a greške je bila na nivou od 0,05, dok je verovatnoća b greške postavljena na 0,20 tj. snaga studije je iznosila $1-b = 0,80$ (80%). Na osnovu analize studije utvrđeno je da je za date kriterijume neohodan uzorak od najmanje 118 pacijenata.

Statistička analiza:

Statistička obrada rezultata izvršiće se pomoću komercijalnog programskog paketa SPSS (verzija 23). U analizi dobijenih rezultata najpre će se koristiti metode deskriptivne statistike za opis karakteristika uzorka: apsolutni brojevi, mere centralne tendencije (aritmetička sredina), mere varijabiliteta (standardna devijacija) i intervalne vrednosti (min i max). Za analizu signifikantnosti razlika tj. potencijalne povezanosti neparametarskih obeležja, između i unutar grupa ćemo koristiti ch2 test i Fisher's exact test. Ukoliko unakrsni prikaz dobijenih parametara ukaže na visoko značajne veze u pojedinim uzajamnim odnosima, radiće se korelaciona analiza (Phi koeficijent) kojom bi se odredila prava mera njihove povezanosti pri čemu će se značajnost veze dokazati značajnošću koeficijenta korelacije, a jačina veze njegovom veličinom. Testiranje značajnosti biće određeno na nivou verovatnoće $p < 0.05$.

B4. Naučni doprinos

U našoj studiji očekujemo da se utvrdi učestalost IHC ekspresije BRAF V600E i mutacije BRAF V600E i njihova povezanost u adenokarcinomu pluća.

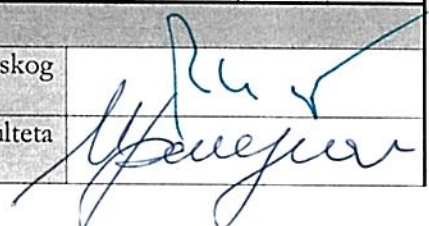
Samo nekoliko prethodnih studija je upoređivalo osetljivost i specifičnost klona VE1 u otkrivanju mutacije BRAF V600E. Kliničke i patohistološke karakteristike pacijenata sa karcinomom pluća koji nose mutaciju BRAF V600E su različite u dosadašnjim studijama (11,16). Utvrđeno je da je povećana ekspresija BRAF V600E receptora nepovoljan prognostički faktor kod adenokarcinoma pluća(12). Ova studija bi mogla razjasniti dijagnostičku vrednost IHC kao alternativne metode za otkrivanje BRAF V600E mutacije kod pacijenata sa adenokarcinomom pluća i njenu povezanost sa demografskim karakteristikama i patohistološkim parametrima. Istraživanjem efikasnosti molekularne terapije BRAF i MEK inhibitorima mogu biti osnov za uvođenje rutinskog protokola za određivanje BRAF statusa kod adenokarcinoma pluća. Doprinos trenutno insuficijentnoj naučnoj literaturi.



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 kandidatu na raspolaganju, a kandidat će eventualne troškove hemikalija i potrošnog materijala neophodnog za izvođenje laboratorijskog dijela istraživanja finansirati lično.

B6. Spisak referenci

1. Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Laversanne, M, Soerjomataram, I, Jemal, A, Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71: 209- 249.
2. National Cancer Institute [homepage on the Internet]. Surveillance, Epidemiology and End Results Program. 2021 [homepage on the Internet] [cited avgust 14]. Available at: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
3. Houston KA, Henley SJ, Li J, White MC, Richards TB. Patterns in lung cancer incidence rates and trends by histologic type in the United States, 2004-2009. *Lung Cancer.* 2014 Oct;86(1):22-8.
4. Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K, Chatila W et al. Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing. *J Clin Oncol.* 2018 Mar 1;36(7):633-641.
5. de Mello RA, Marques DS, Medeiros R, Araujo AM. Epidermal growth factor receptor and K-Ras in non-small cell lung cancer-molecular pathways involved and targeted therapies. *World J Clin Oncol.* 2011;2(11):367-76.
6. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature.* 2018; 553:446-454.
7. Gautschi O, Milia J, Cabarro B, et al. Targeted Therapy for Patients with BRAF-Mutant Lung Cancer Results from the European EURAF Cohort. *Journal of Thoracic Oncology.* 2015; 10:1451-1457.
8. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417:949-954.
9. Nguyen-Ngoc T, Bouchaab H, Adjei AA, Peters S. BRAF Alterations as Therapeutic Targets in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2015 Oct;10(10):1396-403.
10. Chambard JC, Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.* 2007; 1773:1299-1310.
11. Roviello, Giandomenico et al. "Advances in anti-BRAF therapies for lung cancer." *Investigational new drugs vol. 39,3 (2021): 879-890.*
12. O'Leary CG, Andelkovic V, Ladwa R, Pavlakis N, Zhou C, Hirsch F, Richard D, O'Byrne K. Targeting BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2019 Dec;8(6):1119-1124.

<p>13. WHO Classification of Tumours Editorial Board. 5th edition. Thoracic tumors. Lyon (France) 2021.</p> <p>14. H. Sasaki, S. Shimizu, Y. Tani et al. "Usefulness of immunohistochemistry for the detection of the BRAF V600E mutation in Japanese lung adenocarcinoma," <i>Lung Cancer</i>, 2013 vol. 82, no. 1, pp. 51–54.</p> <p>15. Hofman V, Benzaquen J, Heeke S. et al. Real-world assessment of the BRAF status in non-squamous cell lung carcinoma using VE1 immunohistochemistry: A single laboratory experience (LPCE, Nice, France). <i>Lung Cancer</i>. 2020 Jul; 145:58-62.</p> <p>16. McEvoy, S.H.; Halpenny, D.F et al. Investigation of patterns of nodal metastases in BRAF mutant lung cancer. <i>Lung Cancer</i> 2017, 108, 62–65.</p>		
Mišljenje i prijedlog komisije		
<p>Nakon uvida u priloženu dokumentaciju, izlaganja kandidata 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>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>		
Predlog izmjene naslova		
Komisija je saglasna sa predloženim naslovom teme doktorske disertacije		
Prijedlog promjene mentora i/ili imenovanje drugog mentora		
/		
Planirana odbrana doktorske disertacije		
Ljetnji semestar akademske 2024.		
Izdvojeno mišljenje		
(popuniti ukoliko neki član komisije ima izdvojeno mišljenje)		
		Ime i prezime _____
Napomena		
/		
ZAKLJUČAK		
Predložena tema po svom sadržaju odgovara nivou doktorskih studija	DA	NE
Tema omogućava izradu originalnog naučno-istraživačkog rada koji odgovara međunarodnim kriterijumima kvaliteta disertacije.	DA	NE
Kandidat može na osnovu sopstvenog akademskog kvaliteta i stečenog znanja da uz adekvatno mentorsko vođenje realizuje postavljeni cilj	DA	NE
Komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata		
Prof. dr Miodrag Radunović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, naučna oblast: hirurgija		
Prof. dr Milana Panjković, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, oblast: Klinička patologija		

Prof. dr Mileta Golubović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, naučna oblast: patološka anatomija	
U Podgorici, 20.03.2023. godine	DEKAN 



PRILOG

PITANJA KOMISIJE ZA OCJENU PODOBNOSTI TEME I KANDIDATA	
Prof. dr Milana Panjković	Koliki će biti minimalni broj ispitanika u studiji? Koliki je očekivani br ispitanika u studiji?
Prof. dr Mileta Golubović	Kolika je očekivana senzitivnost i specifičnost IHC ekspresije BRAF V600E i mutacije gena?
PITANJA PUBLIKE DATA U PISANOJ FORMI	
(Ime i prezime)	/
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
ZNAČAJNI KOMENTARI	
/	



MEDICINSKI FAKULTET			
Primjerno	31.10.2022		
Org. jed.	Broj	Prilog	...
med	1805		

UNIVERZITET CRNE GORE
Obrazac PD: Prijava teme doktorske disertacije

PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Dr Branko Čampar
Fakultet	Medicinski fakultet
Studijski program	Medicina
Broj indeksa	17/09
Ime i prezime roditelja	Dragovan Čampar
Datum i mjesto rođenja	07.01.1976 Priština
Adresa prebivališta	Borisa Kidriča 18
Telefon	069/304-832
E-mail	
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	1982-1990- Osnovna škola „Hasan Priština“ Priština, Srbija Prosječna ocjena: odličan 5:00 1990-1994- Gimnazija u Prištini, Srbija Smjer prirodno-matematički, prosječna ocjena: odličan 5.00 1994-2001- Medicinski fakultet u Beogradu, Srbija Smjer : Medicina Zvanje: doktor medicine Prosječna ocjena: 8,34 2004-2009- Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija Specijalističke studije iz opšte hirurgije. Zvanje: specijalista opšte hirurgije Prosječna ocjena: odličan A 2013-2015- Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu , Srbija Specijalističke studije iz grudne hirurgije Zvanje: specijalista grudne hirurgije Prosječna ocjena : odličan A
Radno iskustvo	2001-2002 Opšti staž doktora medicine- JZU Dom Zdravlja Podgorica 2002-2003- sluzenje regovnog vojnog roka 2003-2004- Klinički ljekar na Hirurgiji, KCCG 2004-2009- Specijalizacija iz opšte hirurgije, KCCG, Klinički centar Srbije. 2009-2013- Specijalista opšte hirurgije, KCCG 2013- 2015- Specijalizacija iz grudne hirurgije- KCCG, Institut za plućne bolesti Vojvodine, Klinika za grudnu hirurgiju Golnik. 2015- specijalista opšte i grudne hirurgije , Hirurška klinika, KCCG 2021- Načelnik centra za grudnu hirurgiju
Popis radova	Naučni radovi koji se citiraju u međunarodnim naučnim bazama:

Obrazac PD: Prijava teme doktorske disertacije

	<p>1. Muzurović E, Smolović B, Miladinović M, Muhović D, Čampar B. Diagnosis and treatment of mediastinal ectopic thyroid tissue with normally located thyroid gland and primary hyperparathyroidism: a case report. <i>Gland Surg.</i> 2021;10(4):1532-41.</p> <p>2. Čampar B, Klepetko W. Subglottic tracheal stenosis, resection and reconstruction: a case report. <i>Serb J Exp Clin Res.</i> In press. DOI: 10.2478/sjccr-2021-0063</p> <p>Naučni radovi prezentovani na kongresima:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mijović M, Vujadinović O, Čampar B, Radović S. Minimal invasive pectus excavatum repair procedure by Nuss - Our experience. In: Symposium of Cardiothoracic Surgery; 2006 Nov; Belgrade, Serbia. 2. Ljubić V, Rakočević B, Mugoša B, Čampar B, Medenica S. Hepatitis A virus infection frequency in Montenegro 1996-2006. god. In: 5th Balkan Congress for Microbiology; 2007 Oct 24-27; Budva, Montenegro. 3. Milačić B, Mijović M, Vujadinović O, Čampar B, Dedić S, Paunović M, et al. VATS u dijagnostici i tretmanu bolesnika sa malignim pleuralnim izlivima. U: 10. Hrvatski kongres endoskopske kirurgije sa međunarodnim sudjelovanjem; 2010 Okt 17-20; Split, Croatia. 4. Mijović M, Vujadinović O, Čampar B, Milačić B, Radović S. VATS resekcija u tretmanu malignih bolesti pluća. U: 10. Hrvatski kongres endoskopske kirurgije sa međunarodnim sudjelovanjem; 2010 Okt 17-20; Split, Croatia. 5. Čampar B, Mijović M, Vujadinović O, Paunović M, Dedić S, Radović S, et al. VATS u dijagnostici proširenosti malignih tumora jednjaka. U: 10. Hrvatski kongres endoskopske kirurgije sa međunarodnim sudjelovanjem; 2010 Okt, 17-20; Split, Croatia. 6. Paunović J, Pantović V, Paunović M, Čampar B, Dedić S. Netenzione metode-Zlatni standard u hirurškom liječenju ingvinalnih hernija. U: 33. Sabor ljekara sjeverne Crne Gore i jugozapadne Srbije: zbornik radova; 2012 Sep 14-15; Berane, Montenegro. 7. Mijović M, Vujadinović O, Čampar B, Milačić B, Đurović D, Kolinović M. Hirurški tretman stenoza traheje. <i>Medicinski zapisi.</i> 2013;62(1):24-5. 8. Milačić M, Mijović M, Vujadinović O, Čampar B, Đurović D, Kolinović M. Palijativni tretman malignih efuzija. <i>Medicinski zapisi.</i> 2013;62(1):25-6. 9. Đurović D, Mijović M, Vujadinović O, Čampar B, Milačić B, Kolinović M. Harmonic scalpel-Nova tehnika u hirurgiji štitaste žlijezde. <i>Medicinski zapisi.</i> 2013;62(1):26. 10. Čampar B, Mijović M, Vujadinović O, Milačić B, Đurović D, Kolinović M. Značaj medijastinoskopije u stejdžingu karcinoma pluća. <i>Medicinski zapisi.</i> 2013;62(1):27. 11. Čampar B. Trauma grudnog koša. Naučni skup: Politrauma -
--	---

	Zanemarena bolest savremenog doba (CANU-2020); 2019 Sep 20; Podgorica, Montenegro.
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	KLINIČKO-PATOLOŠKE KARAKTERISTIKE ADENOKARCINOMA PLUĆA SA BRAF V600E MUTACIJOM
Na engleskom jeziku	CLINICAL AND PATHOLOGICAL CHARACTERISTICS ADENOCARCINOMA OF THE LUNG WITH BRAF V600E MUTATION
Obrazloženje teme	
<p>Karcinom pluća sa prosečno 2.2 miliona slučajeva i 1.8 miliona smrtnih slučajeva je drugi najčešće dijagnostikovani karcinom i vodeći uzrok smrtnosti od karcinoma u 2020. godini (1). Procenjeno je bilo da će 2021. godine u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) biti 235.760 novih slučajeva karcinoma pluća od čega će 131.880 ljudi umrijeti od ove bolesti (2). Nesitnoćelijski karcinomi pluća (NSCLC) čine 85% svih karcinoma pluća od kojih su najčešći adenokarcinom (44%) i skvamozni karcinom (26%). Incidencija karcinoma pluća je 1.5 puta veća kod muškaraca u odnosu na žene (3). Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa karcinomom pluća između 10-20% u većini zemalja, sa najvećom stopom u Japanu (33%) (1). Zbog niske stope petogodišnjeg preživljavanja cilj je pronaći nove terapijske modalitete, pre svega ciljane molekularne terapije. Napredak u lečenju NSCLC zasnovan je na razumevanju njegovih histoloških i molekularnih karakteristika koje dovode do razvoja novih ciljanih molekularnih terapija (4). Objavljen je mali broj studija koje analiziraju učestalost IHC ekspresije i mutacije BRAF V600E gena kod adenokarcinoma pluća. Ovo je brz, specifičan i veoma senzitivna metoda koja vodi ka naprednom stejdzingu pozitivnog tumora za liječenje BRAF inhibitorima.</p>	
Pregled istraživanja	
<p>Analiza molekularnih puteva je ključ za bolje razumevanje karcinoma pluća. Postoje najmanje 2 molekularna puta u karcinogenezi pluća. Jedan je povezan sa pušenjem i aktiviranjem Kirsten rat sarkoma virusa (KRAS-a), a drugi se javlja kod nepušača i ima aktivaciju sa receptorom epidermalnog faktora rasta (EGFR) (5). Najčešća genetska alteracija kod NSCLC je povezana sa mutacijom EGFR gena. Ova mutacija je prisutna u oko 10-13% pacijenata bele rase i ima ulogu u ranoj fazi tumorske inicijacije što predstavlja potencijalnu metu za ciljanu terapiju (6). Druge važne mutacije su povezane sa anaplastičkim limfomom kinaza genom preuređenja (ALK) i c-ros onkogenom 1 (ROS1). Kod karcinoma pluća su otkrivene mutacije i HER2 (humani epidermalni faktor rasta 2), MET (faktor rasta hepatocita) i RET (preuređenja tokom transfekcije) gena, a nedavno dodatnim molekularnim ispitivanjima indentifikovane su i mutacije v-raf mišjeg sarkoma onkogenog homologa B (BRAF) i mutacije u genu neurotrofične tropomiozin receptor kinaze (NTRK). Sve ove mutacije se potencijalno mogu lečiti (7). BRAF protoonkogen je član RAF familije serin/treonin kinaze, uključujući izoforme, v-RAF mišji sarkom virusa onkogenog homologa A (ARAF). Onkogene mutacije RAS-a i BRAF-a obično su međusobno isključujući događaji. BRAF je mutiran u 8% od svih humanih karcinoma, predominantno u leukemiji vlasastih ćelija (100%), melanomu (>60%), kolorektalnom karcinomu (10%), i ređe u karcinomu pluća i jajnika. BRAF mutacije otkrivene su u 2-4 % karcinoma pluća, što je manje od učestalosti mutacija EGFR-a (10-15%) i neznatno manje od mutacije humanog anaplastičnog limfoma tirozin kinaze (ALK) koja se javlja u 3-5% slučajeva (8). Gotovo sve BRAF mutacije indentifikovane su u egzonu 11 i 15. Tačkasta mutacija u egzonu 15 BRAF gena rezultira</p>	

suptitucijom valina i glutamata kodona 600 (V 600) koji utiče na kinazni domen BRAF proteina (9). Ova promena dovodi do konstitutivne aktivacije B-raf kinaze i naknadne transdukcije signala do mitogen-aktivirane protein kinaze kaskade (MAPK), ekstracelularne signalno regulisane kinaze (EPK), što rezultira 10-strukim povećanjem aktivnosti BRAF-a u odnosu na aktivnost u divljem tipu proteina(WT) (10). Mutacija BRAF V600E indukuje samoodrživu konstantnu aktivaciju MAPK/ERK puta, čime se inhibira kontrolisana ćelijska smrt apoptozom posrednom regulacijom bcl-2 antagonist ćelijske smrti (BAD). Put BRAF V600E drastično povećava bazalne nivoe proliferacije, u skladu sa onkogenim razvojem. Zbog toga bi mutacija BRAF V600E mogla biti ciljana za lečenje specifičnim inhibitorima koji bi doveli do povećanja apoptotičke aktivnosti (11). Metode koje se koriste za detekciju BRAF V600E su imunohistohemija (IHC) sa korišćenjem VE1 antitela i lančana reakcija polimeraze (PCR). Vemurafenib i Dabrafenib su inhibitori serin/reonin kinaze BRAF tipa, koji imaju veću selektivnost za mutirani protein BRAF V600E od BRAF WT, koji nema aktivnost protiv drugih humanih kinaza.(12)

Cilj i hipoteze

Ciljevi dokorskog istraživanja su:

1. Utvrditi učestalost IHC ekspresije BRAFV600E u adenokarcinomu pluća.
2. Utvrditi učestalost mutacije BRAFV600E gena.
3. Uporediti dobijene rezultate IHC ekspresije BRAFV600E sa dobijenim rezultatima mutacije BRAFV600E gena.
4. Uporediti učestalost pozitivne IHC ekspresije BRAFV600E I prisutne BRAF mutacije kod različitih histoloških pod tipova adenocarcinoma pluća (acinarni, papilarni, lepidični, mikropapilarni, solidnim drugim varijantama adenokarcinoma) na osnovu nove klasifikacije SZO (13).
5. Utvrditi da li je pozitivna IHC ekspresija BRAFV600E I prisutna mutacija BRAF gena povezana sa demografskim parametrima, pušačkim statusom, pojavom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima ili udaljenim organima, infiltracijom pleure I okolnih struktura, odnosno stadijumom bolesti.

Na osnovu navedenih ciljeva, postavljene su sledeće hipoteze:

- H1. Pozitivna IHC ekspresija BRAFV600E u adenokarcinomu pluća je veća od 1,5 %.
- H2. Učestalost mutacije BRAFV600E gena je veća od 1,5%.

H3. Dobijeni rezultati pozitivne IHC ekspresije BRAFV600E sa dobijenim rezultatima prisutne mutacije BRAFV600E gena slažu se u više od 80%.

H4. Pozitivna IHC ekspresija I prisutna BRAFV600E mutacija češći su kod acinarnih, solidnih i mikropapilarnih adenocarcinoma pluća u odnosu na druge histološke tipove.

H 5. Pozitivna IHC ekspresija I prisutna BRAFV600E mutacija je češća kod žena i nepušača, sa infiltracijom pleure i okolnih struktura, i sa većim stadijumom bolesti.

Materijali, metode i plan istraživanja

Uzorkovanje

Uzorkovanje bi se izvršilo prostom randomizacijom pacijenata operisanih zbog adenokarcinoma pluća u vremenskom periodu od januara 2016 do decembra 2022. godine. U ovom istraživanju bi se koristio operativni materijal koji je ukalupljen u parafinske blokove i arhiviran u centru za patologiju KCCG. Podaci za sve pacijente biće dobijeni iz istorija bolesti, onkoloških kartona i patohistoloških nalaza. Kriterijumi za isključenje iz studije biće eventualni nedostatak podataka iz medicinske dokumentacije i materijal neadekvatan za analizu. Pacijenti kod kojih bude nađena pozitivna IHC ekspresija BRAF V600E će biti testirani PCR-om na BRAF mutaciju.

Istraživanje retrospektivno-prospektivnog karaktera biće sprovedeno u Centru za patologiju Kliničkog Centra CrneGore (KCCG). Studija će obuhvatiti pacijente KCCG koji su operisani u periodu od januara 2016. do decembra 2022. godine i kod kojih je na operativnom materijalu patohistološki dokazan invazivni adenokarcinom pluća. U retrospektivnom delu studije pločice i kalupi iz arhive Centra za patologiju ponovo će biti patohistološki analizirani. Deo iz očuvanog, vitalnog dela tumorskog tkiva biće označen na pločici i kalupu i taj deo će se podvrgnuti imunohistohemijskom bojenju BRAFV600E (VE1) antitelom i molekularnom PCR testiranju BRAFV600E mutacije. U prospektivnom delu studije, uzorci tkiva pluća dobijeni operativnim putem biće fiksirani u 10% neutralnom formalinu i nakon kalupljenja u parafinu sečeni mikrotomom na tkivne isečke debljine 4 mikrona, a potom deparafinisani i bojeni Hematoxylin-Eosin (HE) metodom i mikroskopski analizirani. Deo vitalnog tumorskog tkiva biće označen na pločici i kalupu i taj deo tkiva će se podvrgnuti imunohistohemijskom bojenju BRAFV600E (VE1) antitelom i molekularnom PCR testiranju BRAFV600E mutacije.

Izvođenje metode: Uzorci tumorskog tkiva pacijenata bojiće se IHC korišćenjem primarnog mišijeg monoklalnog antitela, BRAFV600E (VE1) u BenchMark[®]XT aparatu (Ventana Medical Systems) sa ćelijskim kondicionerom 1 (CC1) tokom 64 min, preperoksidaza inhibicijom i inkubacijom primarnog antitela 16 min na 37 ° C. Konačna koncentracija antitela će biti ~ 12 mg/ml. OptiView DABIHC komplet za otkrivanje će biti korišćen za detekciju ekspresije BRAFV600E proteina. Tkiva će biti obojena hematoxilinom II i Bluing reagensom u trajanju od 4 min. Za merenje nespecifičnog pozadinskog signala, svako tkivo će biti obojeno mišijim monoklonskim antitelom (MOPC-21). Kao pozitivna i negativna kontrola koristiće se uzorci tkiva metastatskog melanoma koji su ranije višestruko testirani i kod kojih je imunohistohemijska ekspresija BRAF V600E (VE1) bila pozitivna ocenjena sa 3+ i negativna ocenjena sa 0. Za interpretaciju imunohistohemijske ekspresije BRAF V600E antitela koristiće se obrazac prema preporukama (Sasaki et al, 2013.) za određivanje IHC BRAF V600E ekspresije kod adenokarcinoma pluća. Tumor će se smatrati pozitivnim ako u više od 50% tumorskih ćelija postoji nedvosmisleno, uniformno citoplazmatsko bojenje, a intenzitet bojenja ocenjivaće se sa: 0 (negativno), 1+ (slabo

citoplazmatsko bojenje), 2+ (umereno citoplazmatsko bojenje) i 3+ (jako citoplazmatsko bojenje) (14). Tumori koji su IHC ocenjeni sa 1+, 2+ i 3+ biće označeni kao pozitivni i ti uzorci će biti podvrgnuti PCR testiranju BRAF V600E mutacije. Kao kontrolna grupa uzeće se isti broj negativno IHC ocenjenih sa 0 uzoraka tumora i ti uzorci će se PCR testirati na BRAFV600E mutaciju. BRAF V600E Sanger sekvencioniranje će se izvoditi ekstrahovanjem genomske DNK iz isečaka debljine 20 mikrona. Prajmeri za Sanger sekvencioniranje će pojačati region egzona 15 BRAF gena koji kodira sekvence na mestu mutacije i nekoliko nukleotida u intronu na oba kraja. Koristiće se dva prajmera: 1) BRAF-ex15FTGCTTGCTCTGATAGGAAAATG i 2) BRAF-ex15RAGCATCTCAGGGCCAAAAT. Lanci će biti sekvencionirani u oba pravca na Applied Biosystem's 3730xl DNA Analyzer-u i analizirani pomoću DNASTAR Lasergene 12 software (DNASTAR, Madison, WI). U odnosu na IHC ekspresiju BRAF V600E (VE1) pacijenti će biti podeljeni u dve grupe: grupa pacijenata sa pozitivnom ekspresijom (ocenjeni sa 1+, 2+ i 3+) i grupa pacijenata sa negativnom ekspresijom (ocenjeni sa 0). Grupe će se upoređivati u odnosu na demografske parametre, pušački status, prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, udaljenim organima, infiltracijom pleure i okolnih struktura, odnosno sa stadijumom bolesti. U odnosu na mutaciju BRAF V600E gena pacijenti će biti podeljeni u dve grupe: grupa pacijenata sa prisutnom BRAF V600E mutacijom i grupa pacijenata sa odsutnom BRAF V600E mutacijom. Grupe će se upoređivati u odnosu na demografske parametre, pušački status, prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, udaljenim organima, infiltracijom pleure i okolnih struktura, odnosno sa stadijumom bolesti. Evaluacija imunohistohemijske ekspresije i mutacije BRAF V600E će biti izvršena od strane dva posmatrača. U slučajevima gde bude postojalo neslaganje tražiće se mišljenje i trećeg, supervizora, koji se u svakodnevnom radu bavi dominantno plućnom patologijom sa najdužim stažom u ovoj oblasti.

NEZAVISNE VARIJABLE (Uzrok)

- Demografske karakteristike pacijenata (starost i spol)
- Pušački status
- Veličina tumora
- Tip adenokarcinoma
- Infiltracija pleure i medijastinalnih struktura
- Prisustvo metastaza u limfnim čvorovima
- Prisustvo udaljenih metastaza
- Patohistološki stadijum bolesti (pTNM)
- Klinički stadijum bolesti

ZAVISNE VARIJABLE (Ishod)

- Ekspresija BRAF V600E proteina
- Mutacija BRAF V600E gena

SNAGA ISTRAŽIVANJA I VELIČINA UZORKA

Veličina uzorka je izračunata na osnovu podataka o ekspresiji BRAF V600E u adenokarcinomima pluća, a ovi podaci su dobijeni iz studije Hofman i saradnika (15).

Prema podacima iz literature oko 3% adenokarcinoma pluća ima pozitivnu ekspresiju BRAFV600E, od kojih je oko 83% slučajeva imalo PCR potvrđenu BRAFV600E mutaciju. Opravdanost broja ispitanika potrebnih za studiju je izračunat koristeći program G*Power 3.1.9.7 i apriori analizu za ch2 test (tabele kontigencije) gde je stepen slobode $Df = (\text{broj reda} - 1) \times (\text{broj kolone} - 1) = 15$. Ulazni parametri su bili sledeći: veličina efekta je iznosila 0,4; verovatnoća greške je bila na nivou od 0,05, dok je verovatnoća greške postavljena na 0,20 tj. snaga studije je iznosila $1-b = 0,80$ (80%). Na osnovu analize studije utvrđeno je daje za date kriterijume neophodan uzorak od najmanje 118 pacijenata.

STATISTIČKA OBRADA

Statistička obrada rezultata izvršiće se pomoću komercijalnog programskog paketa SPSS (verzija 23). U analizi dobijenih rezultata najpre će se koristiti metode deskriptivne statistike za opis karakteristika uzorka: apsolutni brojevi, mere centralne tendencije (aritmetička sredina), mere varijabiliteta (standardna devijacija) i interval ne vrednosti (minimax). Za analizu signifikantnosti razlika tj. potencijalne povezanosti neparametarskih obeležja, između i unutar grupa ćemo koristiti ch2 test i Fisher's exact test. Ukoliko unakrsni prikaz dobijenih parametara ukaže na visoko značajne veze u pojedinim uzajamnim odnosima, radiće se korelaciona analiza (Phikoefficijent) kojom bi se odredila prava mera njihove povezanosti pri čemu će se značajnost veze dokazati značajnošću koeficijenta korelacije, a jačina veze njegovom veličinom. Testiranje značajnosti biće određeno na nivou verovatnoće $p < 0.05$.

Očekivani naučni doprinos

U našoj studiji očekujemo da se utvrdi učestalost IHC ekspresije BRAF V600E i mutacije BRAF V600E i njihova povezanost u adenokarcinomu pluća.

Samo nekoliko prethodnih studija je upoređivalo osetljivost i specifičnost klona VE1 u otkrivanju mutacije BRAF V600E. Kliničke i patohistološke karakteristike pacijenata sa karcinomom pluća koji nose mutaciju BRAF V600E su različite u dosadašnjim studijama (11,16). Utvrđeno je da je povećana ekspresija BRAF V600E receptora nepovoljan prognostički faktor kod adenokarcinoma pluća (12). Ova studija bi mogla razjasniti dijagnostičku vrednost IHC kao alternativne metode za otkrivanje BRAF V600E mutacije kod pacijenata sa adenokarcinomom pluća i njenu povezanost sa demografskim karakteristikama i patohistološkim parametrima. Istraživanjem efikasnosti molekularne terapije BRAF i MEK inhibitorima mogu biti osnov za uvođenje rutinskog protokola za određivanje BRAF statusa kod adenokarcinoma pluća.

Spisak objavljenih radova kandidata

1. Muzurović E, Smolović B, Miladinović M, Muhović D, Čampar B. Diagnosis and treatment of mediastinal ectopic thyroid tissue with normally located thyroid gland and primary hyperparathyroidism: a case report. *Gland Surg.* 2021;10(4):1532-41.
2. Čampar B, Klepetko W. Subglottic tracheal stenosis, resection and reconstruction: a case report. *Serb J Exp Clin Res.* In press. DOI: 10.2478/sjcr-2021-0063

Popis literature

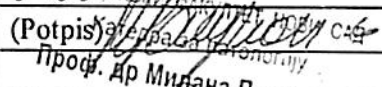
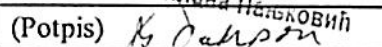
1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. National Cancer Institute [Internet]. Surveillance, Epidemiology and End Results Program. 2021 [cited Aug 14]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
3. Houston KA, Henley SJ, Li J, White MC, Richards TB. Patterns in lung cancer incidence rates and trends by histologic type in the United States, 2004-2009. *Lung Cancer.*

2014;86(1):22-8.

4. Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K, Chatila W, Jonsson P, Halpenny P, et al. Molecular determinants of response to anti-programmed cell death (PD)-1 and anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) blockade in patients with non-small-cell lung cancer profiled with targeted next-generation sequencing. *J Clin Oncol*. 2018;36(7):633-41.
5. de Mello RA, Marques DS, Medeiros R, Araujo AM. Epidermal growth factor receptor and K-Ras in non-small cell lung cancer-molecular pathways involved and targeted therapies. *World J Clin Oncol*. 2011;2(11):367-76.
6. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553(7689):446-54.
7. Gautschi O, Milia J, Cabarro B, Bluthgen MV, Besse B, Smit EF, et al. Targeted therapy for patients with BRAF-mutant lung cancer results from the European EURAF Cohort. *J Thorac Oncol*. 2015;10(10):1451-7.
8. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins D, Clegg S, et al. Mutations of BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
9. Nguyen-Ngoc T, Bouchaab H, Adjei AA, Peters S. BRAF alterations as therapeutic targets in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;10(10):1396-403.
10. Chambard JC, Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1299-310.
11. Roviello G, D' Angelo A, Sirico M, Pittacolo M, Conter FU, Sobhani N. Advances in anti-BRAF therapies for lung cancer. *Invest New Drugs*. 2021;39(3):879-90.
12. O'Leary CG, Andelkovic V, Ladwa R, Pavlakis N, Zhou C, Hirsch F, et al. Targeting BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2019;8(6):1119-24.
13. Thoracic Tumours - WHO Classification of Tumours. 5th ed. Lyon, France: CEDEX; 2021.
14. Sasaki H, Shimizu S, Tani Y, Shitara M, Okuda K, Hikosaka Y, et al. Usefulness of immunohistochemistry for the detection of the BRAF V600E mutation in Japanese lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2013;82(1):51-4.
15. Hofman V, Benzaquen J, Heeke S, Lassalle S, Poundenx M, Long E, et al. Real-world assessment of the BRAF status in non-squamous cell lung carcinoma using VE1 immunohistochemistry: a single laboratory experience (LPCE, Nice, France). *Lung Cancer*. 2020;145:58-62.
16. McEvoy SH, Halpenny DF, Vitery-Jusue A, Hayes SA, Plodkowski AJ, Riely GJ, et al. Investigation of patterns of nodal metastases in BRAF mutant lung cancer. *Lung Cancer*. 2017;108:62-5.

SAGLASNOST PREDLOŽENOG/MENTORA I DOKTORANDA SA PRIJAVOM

Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje.

Prvi mentor	Prof. dr Milana Panjković	(Potpis) 
Drugi mentor		Проф. др Милана Панковић
Doktorand	Branko Čampar	(Potpis) 

IZJAVA

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

 U (Podgorici),
 (30.08.2022)



UNIVERZITET CRNE GORE
Obrazac PD: Prijava teme doktorske disertacije

	Ime i prezime doktoranta — Branko Čampar —
--	---