

OCJENA PRIJAVE DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Dr Enisa Žarić
Fakultet	Medicinski Fakultet
Studijski program	Medicina
Broj indeksa	2/09
Podaci o magistarskom radu	/
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	Prognostički značaj nalaza jedne dodatne kopije u odnosu na višestruke kopije regiona 21 dugog kraka hromozoma 1 na tok bolesti i ishod liječenja kod bolesnika sa multiplom mijelomom
Na engleskom jeziku	Prognostic significance of gain in comparison to amplification of region 21 at chromosome 1 to the course of disease and treatment outcome in patients with multiple myeloma
Datum prihvatanja teme i kandidata na sjednici Vijeća organizacione jedinice	
Naučna oblast doktorske disertacije	Hematologija / Interna medicina
Za navedenu oblast matični su sljedeći fakulteti	
Na Univerzitetu Crne Gore -Medicinski fakultet -Studijski program Medicina	
A. IZVJEŠTAJ SA JAVNE ODBRANE POLAZNIH ISTRAŽIVANJA DOKTORSKE DISERTACIJE	
Javna odbrana ciljeva i očekivanih rezultata, kao i istraživačkog plana doktorske disertacije, dr Enise Žarić, održana je 05.06.2023. godine sa početkom u 14 časova u Sali za sastanke (dekanat) na Medicinskom fakultetu u Podgorici, pred Komisijom u sastavu: Prof. dr Mileta Golubović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, predsjednik Prof. dr Jelena Bila, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, mentor, član Prof. dr Vladimir Todorović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, član U tridesetominutnom izlaganju kandidatkinja je obrazložila predloženu temu doktorske disertacije, dosadašnja istraživanja u svijetu na tu temu, definisala ciljeve i hipoteze koje će biti proverene tokom istraživanja i izrade doktorske disertacije. Kandidatkinja je Komisiju upoznala sa ispitanicima i metodologijom rada, statističkom analizom, kao i očekivanim naučnim doprinosom. Nakon izlaganja kandidatkinje članovi Komisije su postavljali pitanja na koja je kandidatkinja uspešno odgovorila, dali komentare i sugestije za uspešan završetak doktorske	

disertacije. Komisija je jednoglasno donijela odluku da je kandidatkinja dr Enisa Žarić odbranila podobnost teme doktorske disertacije.

B. OCJENA PRIJAVE TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

B1. Obrazloženje teme

I pored svih napredaka u liječenju, multipli mijelom je i dalje neizlječiva bolest uz ograničeno prosječno preživljavanje oboljelih. Multipli mijelom se karakteriše kaskadnim tokom zamaha i remisija, uz sve kraće trajanje svake slijedeće remisije i neminovnom terminalnom fazom refraktarnosti na liječenje. Napretci u liječenju su omogućili da multipli mijelom poprimi karakteristike dobro kontrolisanog hroničnog stanja, uz postizanje prosječne dužine života zdrave ljudske populacije kod 15% bolesnika. Pored jasno definisanih kliničkih i laboratorijskih parametara koji su sastavni dio prognostičkih modela kao što su istorijska Salmon&Durie klasifikacija i Internacionalni „Staging“ Sistem (ISS skor), savremene studije su usmjerene na ispitivanje molekularno-genetičkih entiteta od prognostičkog značaja na tok bolesti i ishod liječenja kod bolesnika sa multiplim mijelomom i kao takve predstavljaju jedan od kriterijuma Revidiranog ISS skora (R-ISS) i druge revizije R-ISS skora (R2-ISS) [1,2,3].

Multipli mijelom je oboljenje za koje se vezuju visok stepen genomske nestabilnosti i česte numeričke i strukturne hromozomske aberacije koje uključuju translokaciju lokusa za teške lance imunoglobulina (IgH) tzv. Primarne translokacije kao što su t(4;14), t(14;16), t(6;14) i t(11;14). Tokom bolesti, zbog genske nestabilnosti dolazi do pojave sekundarnih hromozomskih abnormalnosti kao odraz postojanja brojnih subklonova u multiplom mijelomu [4,5,6,7].

Translokacija t(4;14) je prisutna kod 15% bolesnika sa multiplim mijelomom i povezuje se sa lošim ishodom i mogućom rezistencijom na alkilirajuće agense kod pacijenata koji primaju visokodoznu hemioterapiju i koji se uključuju u program autologe transplantacije matične ćelije hematopoeze. Kod translokacije t(4;14) metoda prekida na hromozomu 4 je u regiji FGFR3 (fibroblast growth factor 3) gena i on se dovodi u jukstapoziciju sa genom koji kodira sinetezu teških lanaca imunoglobulina na hromozomu 14. Više studija je pokazalo da se uvođenjem bortezomiba u liječenje pacijenata sa translokacijom t(4;14) postiže prevazilaženje negativnog prognostičkog značaja ove translokacije na terapijski odgovor, tok i ishod bolesti [2,6,8,9].

Rijede zastupljena translokacija t(14;16), u manje od 5% pacijenata sa multiplim mijelomom, uzrokuje ushodnu regulaciju ekspresije onkogen c-MAF, što se takođe vezuje sa lošim kliničkim tokom bolesti [2,10].

Translokacija t(11;14) prisutna je u oko 17% bolesnika sa multiplim mijelomom, uzrokuje ushodnu regulaciju ciklin D gena koji imaju ključnu ulogu u ćelijskom ciklusu i ne vezuje se loš klinički tok [6,11,12].

Translokacija t(6;14) ne utiče na dužinu preživljavanja ako je prisutna kao izolovana anomalija [6,13].

Delecija 17p13 je jedan od najznačajnijih prognostičkih markera u multiplom mijelomu. Javlja se kod oko 10% novodijagnostikovanih pacijenata, a njena učestalost raste u kasnijim fazama bolesti. Ova hromozomska anomalija limitira ključnu ulogu p53 u kontroli ćelijskog ciklusa i apoptozi. Vezuje se za agresivnu formu bolesti i loš ishod liječenja čak i u eri savremene terapije, koja podrazumijeva primjenu bortezomiba i imunomodulatornih lijekova [6,14,15,16].

S obzirom na prognostički značaj, u R-ISS skor su uključene t(4;14), t(14;16) i del17p, uz povišenu koncentraciju LDH i klasični ISS skor. Postojanje jedne od navedenih hromozomskih abnormalnosti i/ili povišene koncentracije LDH, I ISS skora 3, definiše R-ISS skor 3 koji ukazuje na agresivan tok bolesti i prosječno preživljavanje koje je značajno kraće u odnosu na bolesnike sa R-ISS skorom 1 [2].

Dodatne kopije hromozoma 1q21 (+1q21) su među najčešćim genetičkim abnormalnostima kod pacijenata sa multiplim mijelomom. Kod 39% novodijagnostikovanih bolesnika sa multiplim mijelomom i 70% onih koji imaju skrivene translokacije t(4;14) i t(14;16) prisutne su dodatne kopije hromozoma 1q21 koje se vezuju za loš terapijski ishod, čak i kod intenzivno liječenih bolesnika [7,17]. Kod pacijenata sa ovom citogenetskom abnormalnošću razlikujemo podgrupu sa jednom dodatnom kopijom 1q21 regiona (dodatak 1q21) i one sa višestrukim kopijama, odnosno amplifikacijom 1q21 regiona (amp 1q21).

B2. Cilj i hipoteze

Cilj rada:

Utvrđiti prognostički značaj nalaza jedne dodatne kopije u odnosu na višestruke kopije regiona 21 dugog kraka hromozoma 1 na postizanje povoljnog terapijskog odgovora, dužinu remisije i ukupno preživljavanje bolesnika sa multiplim mijelomom.

Hipoteza:

Pacijenti sa nalazom višestrukih kopija regiona 21 dugog kraka hromozoma 1 se karakterišu agresivnim tokom bolesti, te slabijim terapijskim odgovorom, kraćim remisijama i ukupnim preživljavanjem u odnosu na bolesnike za nalazom jedne dodatne kopije.

B3. Metode i plan istraživanja

U ovu retrospektivnu studiju je planirano uključanje 100 bolesnika sa dijagnozom multiplog mijeloma i nalazom jedne i/ili više dodatnih kopija regiona 21 dugog kraka hromozoma 1 (dodatak 1q21 i/ili amp1q21), koji su dijagnostikovani i liječeni u Klinici za hematologiju UKCS i Centru za hematologiju KCCG u periodu od januara 2010. do januara 2022. godine.

Dijagnoza multiplog mijeloma kod ispitanika je postavljena u skladu sa kriterijumima Svjetske zdravstvene organizacije [18].

Navedena ispitivanja biće sprovedena u Laboratoriji za citogenetiku i molekularnu genetiku Klinike za hematologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije.

iFISH (interfazna fluorescentna in situ hibridizacija)

U Laboratoriji za citogenetiku i molekularnu genetiku Kliničkog centra Srbije metodom iFISH (interfazna fluorescentna in situ hibridizacija) uradiće se ispitivanje prisustva hromozomskih abnormalnosti: dodatnih kopija hromozoma 1q21, del17p, t(4;14), i t(14;16). Analiza će se raditi iz uzorka mononuklearnih ćelija kostne srži bolesnika (6-10 ml), na selektovanoj populaciji CD138+ plazmocita. Separacija malignih plazmocita će se vršiti pomoću CD138 magnetnih partikula, prema preporukama proizvođača (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Suspenzija izolovanih plazmocita će se nanositi na mikroskopska stakla, na kojima će se potom primijeniti FISH protokol za analizu interfaznih jedara [19]. Prisustvo aberacija će se utvrđivati analizom 100 ili više interfaznih jedara, za svaki ispitivani genski region.

Analiza jedara će se vršiti pomoću mikroskopa Olympus BX51 opremljenog fluorescentnom lampom i pojedinačnim band pass filterima. Slikanje fluorescentnih signala je omogućeno Olympus U-CMAD3 fluorescentnom kamerom (Olympus, Germany), povezano sa Cytovision programom za obradu slika. FISH proba za detekciju aberacija regiona 1q21 je koktel proba koja sadrži 2 genska lokusa (CDKN2C/CKS1B) i omogućava detektovanje delecije regiona 1p32 (obilježeno zelenom bojom), kao i dodatka i amplifikacije 1q21 (obilježeno narandžastom bojom). U slučaju prisutne jedne dodatne kopije regiona 1q21 detektuju se 3 narandžasta signala, a u slučaju prisutne amplifikacije 1q21 regiona detektuju se 4 ili više narandžastih signala.

Statistička analiza

Pored deskriptivnih analiza, aritmetička sredina i standardna devijacija će se koristiti za parametrijske podatke, medijana za deskripciju neparametrijskih podataka. Kao parametarski analitički model primjenjivaće se Studentov T-test, a neparametrijski: Pearson test, χ^2 test, Fisherov test. Veza između kliničkih parametara i citogenetskih karakteristika procijenice se Spearman-ovom korelacijom. Pratiće se odgovor na liječenje i ukupno preživljavanje pacijenata (OS). Kaplan-Meier metoda će se koristiti za analizu ukupnog preživljavanja. Long rank testom evaluirać se značaj analiziranih parametara na ukupno preživljavanje. Korišćenjem Cox-ovog proporcionalnog hazardnog modela određivaće se nezavisni prognozni parametri na dužinu preživljavanja. Koristiće se statistički informacioni softverski sistem, SPSS verzija 22.0. Definisana je nivo statističke značajnosti: visoko statistički značajna povezanost- $p < 0.01$, statistički značajna povezanost $p < 0.05$.

B4. Naučni doprinos

Utvrđivanje prognostičkog značaja navedenih molekularno-genetičkih abnormalnosti na tok i ishod multiplog mijeloma, omogućice definisanje mogućih mehanizama rezistencije u ovoj bolesti sa direktnim kliničkim uticajem na adekvatan terapijski pristup. Identifikacija bolesnika sa nepovoljnim prognostičkim profilom, uključujući kliničke i specifične molekularne činioce kao što je amp1q21, omogućila bi u budućnosti individualni terapijski pristup i ranu primjenu inovativnih vidova liječenja kao što je imunološka terapija poput monoklonskih antitijela, bispecifičnih antitijela i CAR T ćelija. Ovo istraživanje bi ukazalo na značaj uvođenja molekularnih prognostičkih faktora u nove prognostičke modele, u cilju rane detekcije visoko rizičnih bolesnika, izbora optimalne terapije i poboljšanja krajnjeg ishoda liječenja.

B5. Finansijska i organizaciona izvodljivost istraživanja

Istraživanje predložene doktorske disertacije će biće sprovedeno u Laboratoriji za citogenetiku i molekularnu genetiku Klinike za hematologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije. Materijal i metode koje će biti upotrijebljene su već dostupne u svakodnevnom radu. Istraživanje nije nalagalo dodatna finansijska sredstva u odnosu na planiranu standardnu dijagnostiku. Zaključeno je da je istraživanje finansijski i organizaciono izvodljivo.

Reference:

1. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 3412-20.
2. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol.* 2015; 33: 2863-9.
3. D'Agostino M, Cairns DA, Lahuerta JJ, Wester R, Bertsch U, Waage A, et al. Second Revision of the International Staging System (R2-ISS) for Overall Survival in Multiple Myeloma: A European Myeloma Network (EMN) Report Within the HARMONY Project. *J Clin Oncol.* 2022; 40: 3406-3418.
4. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003; 101: 4569-75.
5. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* 2007; 109: 3489-95.
6. Abdi J, Chen G, Chang H. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms. *Oncotarget* 2013;4: 2186-207.
7. Schmidt TM, Barwick BG, Joseph N, Heffner LT, Hofmeister CC, Bernal L, et al. Gain of Chromosome 1q is associated with early progression in multiple myeloma patients treated with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone. *Blood Cancer J.* 2019; 9:94.
8. Kalff A, Spencer A. The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies. *Blood Cancer J.* 2012; 2:e89.
9. Sato S, Kamata W, Okada S, Tamai Y. Clinical and prognostic significance of t(4;14) translocation in multiple myeloma in the era of novel agents. *Int J Hematol.* 2021; 113: 207-213.
10. Avet-Loiseau H, Malard F, Campion L, Magrangeas F, Sebban C, Lioure B, et al. Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor? *Blood* 2011; 117: 2009-11.
11. Hoyer JD, Hanson CA, Fonseca R, Greipp PR, Dewald GW, Kurtin PJ. The (11;14)(q13;q32) translocation in multiple myeloma. A morphologic and immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol.* 2000; 113: 831-7.
12. Paner A, Patel P, Dhakal B. The evolving role of translocation t(11;14) in the biology, prognosis, and management of multiple myeloma. *Blood Rev.* 2020; 41: 100643.
13. Hassan H, Szalat R. Genetic Predictors of Mortality in Patients with Multiple Myeloma. *Appl Clin Genet.* 2021; 14: 241-254.
14. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 2005; 106: 2837-40.
15. Dimopoulos MA, Gutierrez NC, Goldschmidt H, Sonneveld P, Avet-Loiseau H. High subclonal fraction of 17p deletion is associated with poor prognosis in multiple myeloma. *Blood.* 2019; 133: 1217-1221.
16. Liu Z, Zeng Q, Xiang B. Bortezomib-based regimens improve the prognosis of newly diagnosed MM patients with chromosomal aberrations except for del(17q13): A retrospective study from a single center. *Medicine (Baltimore)* 2021; 100: e25834.
17. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, Gutiérrez NC, Liebisch P, O'Connor S, et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2012; 97: 1272-7.

18. Khoury JD, Solary E, Ablu O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36: 1703-1719.
19. Shi Yu, Solomides C, Gong G, Wang Zi-X, Uppal G, Ly V. Fluorescence In Situ Hybridization on Enriched CD138-Positive cells in Plasma Cell Myeloma. *Acta Medica International*. 2015; 2: 168-174.

Mišljenje i prijedlog komisije

Nakon uvida u priloženu dokumentaciju, javnog izlaganja kandidatkinje i diskusije, Komisija je dala pozitivnu ocjenu podobnosti teme i kandidata. Komisija je zaključila:
-Predložena tema doktorske disertacije je aktuelna i originalna i zadovoljava nivo doktorske disertacije

- Izloženi ciljevi i postavljene hipoteze su jasno definisani
- Metodologija istraživanja je detaljno objašnjena
- Tema doktorske disertacije ima prepoznatljiv naučni doprinos.

Uzevši u obzir sve navedeno, Komisija je dala pozitivnu ocjenu podobnosti teme doktorske disertacije. Takođe je mišljenja da kandidatkinja, dr Enisa Žarić, ima potencijal za samostalni istraživački rad nakon što je plan istraživanja uspješno odbranila.

Stoga Komisija predlaže Vijeću Medicinskog fakulteta i Senatu Univerziteta Crne Gore da prihvate ovaj izvještaj i odobre nastavak istraživačkog rada na doktorskoj disertaciji.

Prijedlog izmjene naslova

Komisija je predlaže da se predlog naslova teme doktorske disertacije izmijeni iz :
„Prognostički značaj nalaza jedne dodatne kopije u odnosu na višestruke kopije regiona 21 dugog kraka hromozoma 1 (1q21) na tok bolesti i ishod liječenja kod bolesnika sa multiplom mijelomom“, u :

„Prognostički značaj nalaza jedne dodatne kopije u odnosu na višestruke kopije regiona 21 dugog kraka hromozoma 1 na tok bolesti i ishod liječenja kod bolesnika sa multiplom mijelomom“

Prijedlog promjene mentora i/ili imenovanje drugog mentora

Nije postojao predlog promjene mentora i / ili imenovanje drugog mentora

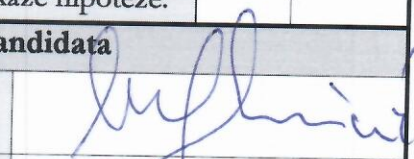
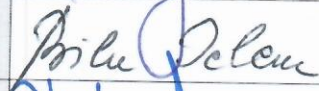
Planirana odbrana doktorske disertacije

Do kraja studijske 2023/2024 godine

Izdvojeno mišljenje

Nije bilo izdvojenih mišljenja

Ime i prezime

Napomena		
(popuniti po potrebi)		
ZAKLJUČAK		
Predložena tema po svom sadržaju odgovara nivou doktorskih studija.	DA	NE
Tema je originalan naučno-istraživački rad 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 i dokaže hipoteze.	DA	NE
Komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata		
Prof. dr Mileta Golubović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, Crna Gora, predsjednik		
Prof. dr Jelena Bila, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Srbija, mentor, član		
Prof. dr Vladimir Todorović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, Crna Gora, član		
U Podgorici, 12.06.2023.		
VF DEKANA Prof. dr Miodrag Radunović MP _____		

PRILOG

PITANJA KOMISIJE ZA OCJENU PRIJAVE DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA	
Prof. dr Mileta Golubović	1. Na koji način će se sprovesti analiza CD 138 pozitivnosti ćelija analiziranog tumorskog tkiva?
Prof. dr Vladimir Todorović	1. Da li će se analizirati preživljavanje bez progresije (PFS) kod ispitanika obuhvaćenih istraživanjem?
(Titula, ime i prezime člana komisije)	
(Titula, ime i prezime člana komisije)	
(Titula, ime i prezime člana komisije)	
PITANJA PUBLIKE DATA U PISANOJ FORMI	
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
ZNAČAJNI KOMENTARI	



UNIVERZITET CRNE GORE MEDICINSKI FAKULTET			
Primljeno:	12.06.2023		
Org. jed.	Broj	Prilog	Vrijednost
med	817		

UNIVERZITET CRNE GORE
Obrazac PD: Prijava teme doktorske disertacije

PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Dr Enisa Žarić
Fakultet	Medicinski fakultet
Studijski program	Medicina
Broj indeksa	2/09
Ime i prezime roditelja	Ilija Žarić
Datum i mjesto rođenja	21.03.1975.
Adresa prebivališta	Ul Miloša Oblića S2B, IV/55a, Podgorica
Telefon	+382 67 611 800
E-mail	enisazaric@gmail.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	21.11.2014. odbranila rad uže specijalizacije "Analiza kliničkih i laboratorijskih parametara pacijenata sa leukemijskom fazom limfoma marginalne zone" sa odličnom ocjenom (10) i stekla zvanje subspecijaliste hematologa 07.04.2014. položila rad polaznih istraživanja doktorskih studija "Uporedna analiza leukemijske faze hroničnih B limfoproliferativnih neoplazmi" sa ocjenom A 2012-2014: Uža specijalizacija hematologije u Kliničkom Centru Srbije, Univerzitet u Beogradu - položila specijalistički ispit 28. 10. 2010. sa odličnom ocjenom (5) i stekla zvanje specijaliste interne medicine 2009- : student doktorskih studija na Medicinskom fakultetu u Podgorici, Univerziteta Crne Gore 2006-2010: Specijalizacija Interne medicine u Kliničkom centru Crne Gore i Kliničkom Centru Srbije (Univerzitet u Beogradu) 1993-2003: Medicinski fakultet univerzitet u Prištini, prosječna ocjena 9,41 1999: završila gimnaziju »Panto Mališić« Berane, Crna Gora sa odličnom srednjom ocjenom (5)
Radno iskustvo	2020-: Načelnik Odjeljenja Hematologije, Centar za hematologiju, Interna Klinika Kliničkog Centra Crne Gore 2017-2020: Načelnik dnevne bolnice Centra za hematologiju, Interna Klinika Kliničkog Centra Crne Gore 2014-: Subspecijalista internista-hematolog u Centru za hematologiju, Klinički Centar Crne Gore 2015-: Saradnik u nastavi na predmetu Interna medicina, Medicinski fakultet u Podgorici, Univerzitet Crne Gore

	• 2010-2014: Specijalista interne medicine u Centru za hematologiju Interne Klinike, Klinički Centar Crne Gore • 2004-2006: Ljekar opšte prakse u JZU DZ - Podgorica, služba Hitne pomoći • 2003-2004: Pripravnički staž u JZU DZ Podgorica • 2003-2008: Saradnik u nastavi na predmetu Medicinska biohemija i hemija, Medicinski fakultet u Podgorici, Univerzitet Crne Gore • 1999-2002: Lokalni koordinator za Crnu Goru međunarodne humanitarne nevladine organizacije Premiere Urgence
Popis radova	1. Zaric E, Ratip S, Kizikilic E, Djurovic M. CNS Toxoplasmosis in haploidentical bone marrow transplant recipient: Case report of successful treatment. Turkish journal of hematology, volume 36, Issue 1, supplement 1, March 2019, P-045. 2. Zaric E, Popovic A. Pregnancy outcomes in a case of protein S deficiency carriers couple. Leukemia research, volume 71, supplement 1, October 2018: PP42 (S48) 3. Zaric E, Todorovic M, Popovic A, Mihaljevic B, Kraguljac N. Predictive markers of mantle cell lymphoma in leukemic phase. Leukemia research, volume 49, supplement 1, October 2016: PP10 (S22) 4. Zaric E, Popovic A, Todorovic M, Mihaljevic B, Kraguljac N. Rare presentation of follicular lymphoma with peripheral blood involvement: clinical characteristics and outcome. Leukemia research, volume 49, supplement 1, October 2016: PP11 (S23) 5. Zaric E. Therapy approach of rare kidney extramedullary plasmacytoma. Leukemia research, volume 49, supplement 1, October 2016: PP09 (S22) 6. Zaric E, Todorovic M, Popovic A, Mihaljevic B, Kraguljac N. Marginal Zone Lymphoma in leukemic phase: clinical characteristics and prognosis. Leukemia research, volume 39, supplement 2, October 2015: PP-099 (S28)
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	Prognostički značaj nalaza jedne dodatne kopije u odnosu na višestruke kopije regiona 21 dugog kraka hromozoma 1 na tok bolesti i ishod liječenja kod bolesnika sa multiplom mijelomom
Na engleskom jeziku	Prognostic significance of gain in comparison to amplification of region 21 at chromosome 1 to the course of disease and treatment outcome in patients with multiple myeloma
Obrazloženje teme	
I pored svih napredaka u liječenju, multipli mijelom je i dalje neizlječiva bolest uz ograničeno prosječno preživljavanje oboljelih. Multipli mijelom se karakteriše kaskadnim tokom zamaha i remisija, uz sve kraće trajanje svake slijedeće remisije i neminovnom terminalnom	

fazom refraktarnosti na liječenje. Napretci u liječenju su omogućili da multipli mijelom poprimi karakteristike dobro kontrolisanog hroničnog stanja, uz postizanje prosječne dužine života zdrave ljudske populacije kod 15% bolesnika. Pored jasno definisanih kliničkih i laboratorijskih parametara koji su sastavni dio prognostičkih modela kao što su istorijska Salmon&Durie klasifikacija i Internacionalni „Staging“ Sistem (ISS skor), savremene studije su usmjerene na ispitivanje molekularno-genetičkih entiteta od prognostičkog značaja na tok bolesti i ishod liječenja kod bolesnika sa multiplim mijelomom i kao takve predstavljaju jedan od kriterijuma Revidiranog ISS skora (R-ISS) i druge revizije R-ISS skora (R2-ISS) [1,2,3].

Multipli mijelom je oboljenje za koje se vezuju visok stepen genomske nestabilnosti i česte numeričke i strukturne hromozomske aberacije koje uključuju translokaciju lokusa za teške lance imunoglobulina (IgH) tzv. primarne translokacije kao što su t(4;14), t(14;16), t(6;14) i t(11;14). Tokom bolesti, zbog genske nestabilnosti dolazi do pojave sekundarnih hromozomskih abnormalnosti kao odraz postojanja brojnih subklonova u multiplom mijelomu [4,5,6,7].

Translokacija t(4;14) je prisutna kod 15% bolesnika sa multiplim mijelomom i povezuje se sa lošim ishodom i mogućom rezistencijom na alkilirajuće agense kod pacijenata koji primaju visokodoznu hemioterapiju i koji se uključuju u program autologe transplantacije matične ćelije hematopoeze. Kod translokacije t(4;14) tačka prekida na hromozomu 4 je u regiji FGFR3 (fibroblast growth factor 3) gena i on se dovodi u jukstapoziciju sa genom koji kodira sinetezu teških lanaca imunoglobulina na hromozomu 14. Više studija je pokazalo da se uvođenjem bortezomiba u liječenje pacijenata sa translokacijom t(4;14) postiže prevazilaženje negativnog prognostičkog značaja ove translokacije na terapijski odgovor, tok i ishod bolesti [2,6,8,9].

Rijeđe zastupljena translokacija t(14;16), u manje od 5% pacijenata sa multiplim mijelomom, uzrokuje ushodnu regulaciju ekspresije onkogena c-MAF, što se takođe vezuje sa lošim kliničkim tokom bolesti [2,10].

Translokacija t(11;14) prisutna je u oko 17% bolesnika sa multiplim mijelomom, uzrokuje ushodnu regulaciju ciklin D gena koji imaju ključnu ulogu u ćelijskom ciklusu i ne vezuje se loš klinički tok [6,11,12].

Translokacija t(6;14) ne utiče na dužinu preživljavanja ako je prisutna kao izolovana anomalija [6,13].

Delecija 17p13 je jedan od najznačajnijih prognostičkih markera u multiplom mijelomu. Javlja se kod oko 10% novodijagnostikovanih pacijenata, a njena učestalost raste u kasnijim fazama bolesti. Ova hromozomska anomalija limitira ključnu ulogu p53 u kontroli ćelijskog ciklusa i apoptozi. Vezuje se za agresivnu formu bolesti i loš ishod liječenja čak i u eri savremene terapije, koja podrazumijeva primjenu bortezomiba i imunomodulatornih lijekova [6,14,15,16].

S obzirom na prognostički značaj, u R-ISS skor su uključene t(4;14), t(14;16) i del17p, uz povišenu koncentraciju LDH I klasični ISS skor. Postojanje jedne od navedenih hromozomskih abnormalnosti i/ili povišene koncentracije LDH, I ISS skora 3, definiše R-ISS skor 3 koji ukazuje na agresivan tok bolesti i prosječno preživljavanje koje je značajno kraće u odnosu na bolesnike sa R-ISS skorom 1 [2].

Dodatne kopije hromozoma 1q21 (+1q21) su među najčešćim genetičkim abnormalnostima kod pacijenata sa multiplim mijelomom. Kod 39% novodijagnostikovanih bolesnika sa multiplim mijelomom i 70% onih koji imaju skrivene translokacije t(4;14) i t(14;16)

prisutne su dodatne kopije hromozoma 1q21 koje se vezuju za loš terapijski ishod, čak i kod intenzivno liječenih bolesnika [7,17].

Pregled istraživanja

Sprovedene studije su pokazale da je +1q21 nezavisan i značajan faktor loše prognoze multiplog mijeloma, posebno kod pacijenata koji se liječe primjenom režima koji sadrže bortezomib [7,18,19]. Kod pacijenata sa ovom citogenetskom abnormalnošću razlikujemo podgrupu sa jednom dodatnom kopijom 1q21 regiona (dodatak 1q21) i one sa višestrukim kopijama, odnosno amplifikacijom 1q21 regiona (amp 1q21).

Zbog svog prognostičkog značaja, hromozomska abnormalnost +1q21 je uključena u visokorizične abnormalnosti u okviru M-SMART klasifikacije a zatim i u R2-ISS skor [3,20].

Dodatak i/ili amp 1q21 se mogu se naći u svim fazama bolesti, od monoklonalne gamopatije neodređenog značaja (MGUS) (15–20%), do tinjajućeg multiplog mijeloma (SSM) (30%). Kod visoko proliferativne bolesti kao što su multipli mijelom (MM) i ekstramedularna bolest (EMD) dolazi do akumulacije dodatnih kopija 1q21, tako da čak 70% pacijenata ima više od tri kopije 1q21 [21,22,23].

Heterogena genetska pozadina pacijenata sa amp 1q21 ima značajan uticaj na preživljavanje u poređenju sa onima koji imaju samo jednu dodatnu kopiju 1q21. Sami region 1q21 sadrži više od 500 gena. Među među analiziranim izdvojili su se geni IL6R, MCL-1, ILF2, BCL9 i CKS1B kao potencijani onkogeni. Rezultati studija dovode ih u vezu sa lošom prognozom pacijenata i rezistencijom na lijekove [24-29].

Imunomodulatorni lijekovi (IMMD) i inhibitori proteazoma (PI) postali su sastavni dio protokola liječenja multiplog mijeloma zbog svoje dobro utvrđene kliničke efikasnosti. Obje grupe lijekova efikasne su u liječenju pacijenata sa MM visokog rizika, posebno pacijenata sa t(4:14) i del(17p). U randomizovanoj studiji, Cavo i sar. zaključeno je da su pacijenti sa t(4:14) i/ili del(17p), liječeni u indukciji kombinacijom bortezomib (PI) + thalidomid (IMMD) + deksametazon (VDT), a potom u nastavku autologom transplantacijom matičnih ćelija hematopoeze (ATMČH), imali duže preživljavanje bez progresije (PFS) i ukupno preživljavanje (OS), u odnosu na pacijente liječene kombinacijom IMMD + deksametazon (TD) [30]. Studija Shaughnessy i sar. ukazuje da pacijenti sa amp 1q21 pri liječenju bortezomibom pokazuju pojačanu regulaciju gena proteazoma, uključujući PSMD4 gen koji se dovodi u vezu sa neželjenim ishodom bolesti [31]. Rezultati ove studije sugerišu da dodatne kopije 1q21 mogu biti u osnovi rezistencije na bortezomib, a klinički tok ove podgrupe pacijenata karakterisala je rana progresija bolesti i kraće OS [31]. Novija retrospektivna studija je pokazala da pacijenti sa dodatkom 1q21 imaju bolji odgovor na VDT indukcionu terapiju u poređenju sa pacijentima bez dodatne kopije 1q21 [7].

Rezultati TT2 studije ukazuju da pacijenti s novodijagnostikovanim multiplim mijelomom (NDMM), koji su imali dokazanu amp 1q21, pokazuju inicijalno agresivniji klinički tok bolesti od onih s dodatkom 1q21, ali su preživljavanje bez događaja (EFS) kao i OS bili slični među analiziranim grupama [18]. S druge strane, u studiji Nebena i sar., iz ispitivanja HOVON-65/GMMG-HD4, pacijenati sa NDMM i amp 1q21 imali su inferiorno OS u poređenju u odnosu na pacijente sa jednom ili bez detektovanih dodatnih kopija na regionu 1q21 [32].

U studiji Walkera i sar. koja je obuhvatila 863 bolesnika s NDMM mlađih od 75 godina,

pacijenti sa višestrukim kupijama regiona 1q21 su pokazali inferiorno PFS i OS u poređenju s pacijentima sa jednom dodatnom kopijom (procijenjene stope u 18 mjeseci, PFS/OS: 71/88% kod jedne dodatne kopije 1q21 u odnosu na 60/73% kod amp 1q21). Kaplan-Maierove krivulje za OS bile su slične između ove dvije podgrupe pacijenata do otprilike 12-og mjeseca nakon početka terapije, nakon čega je uočeno jasno odvajanje krivulja [33].

Studija Hanamure i sar. pokazala je da pacijenti kod kojih je amp 1q21 dokazana na prezentaciji bolesti imaju tendenciju agresivnijeg kliničkog toka od onih sa dodatkom 1q21 [21]. Pacijenti sa relapsno refraktornim multiplim mijelomom (RRMM) i dokazanom amp 1q21 imali su kraći PFS i OS u odnosu na pacijente sa jednom dodatnom kopijom 1q21 [21].

Istraživanje You i sar. obuhvatilo je 135 pacijenata koji su u indukciji tretirani imunomodulatornim lijekom lenalidomidom (R), u sklopu VRD terapijskog protokola sa ili bez ATMČH. Rezultati su ukazali da je PFS kod pacijenata sa utvrđenom amp 1q21 bio kraći u odnosu na one sa jednom dodatnom kopijom 1q21 (medijana PFS je bila 24 mjeseca u odnosu na nedostignutu, $P=0,0403$) [34]. Razlika u OS između dvije analizirane grupe nije bila statistički značajna [34]. Rezultati ukazuju da sprovođenje ATMČH može značajno pomoći u prevazilaženju lošeg prognostičkog značaja dodatnih kopija 1q21 [34].

Predmet aktuelnih istaživanja je efikanost PI druge generacije, karfilzomiba, u kontekstu prevazilaženja rezistencije na bortezomib kod visokorizičnih pacijenata sa MM [35]. Rane faze kliničkih studija ukazuju da primjena indukcionog liječenja protokolima koji sadrže karfilzomib, kod pacijenta sa dijagnozom NDMM visokog rizika, dovodi do visoke stope odgovora uz odsustvo minimalne rezidualne bolesti (MRD) kod značajnog procenta pacijenata. Takođe se ovakvim terapijskim pristupom postiže duži PFS [35]. S druge strane, ohrabruju rezultati studije FORTE vezano za pacijente sa NDMM i dokazanom jednom dodatnom kopijom 1q21 [35]. Pacijenti sa jednom dodatnom kopijom 1q21 koji su liječeni karfilzomib-om u kombinaciji sa ciklofosfamidom i deksametazonom (KRd), prije i nakon ATMČH, imali su duži PFS. S druge strane, nosioci višestrukih kopija 1q21 pokazali veoma slab odgovor na liječenje istim terapijskim modalitetom [35].

Kada govorimo o pacijentima s relapsno refraktarnom formom multiplog mijeloma i potvrđenom amp 1q21 pri relapsu, dokazan je trend kraćeg preživljenja nakon relapsa u poređenju s onima kod kojih je dokazana jedna dodatna kopija 1q21 (5-godišnja stopa preživljenja nakon relapsa, amp 1q21 u odnosu na dodatak 1q21: 0% u odnosu na 32%, $p = 0,06$). U studiji Ziccheddua i sar. sa 42 bolesnika refraktornih na PI i na IMiD, 83% pacijenata je preminulo unutar 1000 dana, amp 1q21 je nađena u 45% analiziranih pacijenata. Rezultati studije su ukazali na značajno loš PFS pacijenta sa amp 1q21, što nije bio slučaj kod pacijenata sa jednom dodatnom kopijom [36].

Koegzistencija 1q21 amp sa drugim nepovoljnim citogenetskim abnormalnostima kao što su $t(4;14)$, $t(14;16)$, $del(1p)$ i $del(17p)$, ima negativan uticaj na ishod multiplog mijeloma [37,38]. Hiperdiploidni pacijenti s +1q21 pokazuju inferiorni PFS u u poređenju s onima bez +1q21 [39]. Nedavno su Abdallah i sar. procijenili uticaj amp 1q21 na kliničke karakteristike i OS u više od 1300 pacijenata s NDMM. Rezultati multivarijantne analize pokazuju da je amp 1q21 bila povezana sa smanjenim OS-om kada su druge citogenetske abnormalnosti, kao što su $del 17$ ili $t(4;14)$, $t(14;16)$, i $t(16;20)$ bile prisutne [40]. Druga studija, Walker-a i sar. okarakterisala je "duble hit" visokorizičnu podgrupu pacijenata sa NDMM. Opisano je da ova grupa pacijenata ima ili bialelnu inaktivaciju TP53 ili ISS stadijum 3 uz istovremeno dokazano

prisustvo više od četiri kopije 1q21. Ova podgrupa je činila samo 6,1% pacijenata u studiji [33]. Osim toga, studija Jin-a i sar. ukazuje da pacijenti s koegzistencijom amp 1q21 i MYC rearanžmanom imaju veću učestalost ekstrapredularne bolesti i hiperkalcijemije u odnosu na pacijente koji su imali samo amp 1q21 ili MYC rearanžman [41]. Stopa kompletnih remisija (CR) i vrlo dobrih parcijalnih remisija (VGPR) bila je relativno niža kod pacijenata s kombinacijom amp 1q21 i MYC rearanžmana u poređenju s pacijentima koji su nosili samo jednu aberaciju [41]. Pacijente sa amp 1q21 i/ili one sa istovremenom pojavom +1q21 i drugih visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti treba smatrati ultra rizičnim i razmotriti agresivnije modalitete liječenja u ranoj fazi bolesti.

Cilj i hipoteze

Cilj rada:

Utvrditi prognostički značaj nalaza jedne dodatne kopije u odnosu na višestruke kopije regiona 21 dugog kraka hromozoma 1 na postizanje povoljnog terapijskog odgovora, dužinu remisije i ukupno preživljavanje bolesnika sa multiplim mijelomom.

Hipoteza:

Pacijenti sa nalazom višestrukih kopija regiona 21 dugog kraka hromozoma 1 se karakterišu agresivnim tokom bolesti, te slabijim terapijskim odgovorom, kraćim remisijama i ukupnim preživljavanjem u odnosu na bolesnike za nalazom jedne dodatne kopije.

Materijali, metode i plan istraživanja

U ovu retrospektivnu studiju je planirano uključanje 100 bolesnika sa dijagnozom multiplog mijeloma i nalazom jedne i/ili više dodatnih kopija regiona 21 dugog kraka hromozoma 1 (dodatak 1q21 i/ili amp1q21), koji su dijagnostikovani i liječeni u Klinici za hematologiju KCS u periodu od januara 2010. do januara 2022. godine.

Dijagnoza multiplog mijeloma kod ispitanika je postavljena u skladu sa kriterijumima Svjetske zdravstvene organizacije [42].

Navedena ispitivanja biće sprovedena u Laboratoriji za citogenetiku i molekularnu genetiku Klinike za hematologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije.

iFISH (interfazna fluorescentna *in situ* hibridizacija)

U Laboratoriji za citogenetiku i molekularnu genetiku Kliničkog centra Srbije metodom iFISH (interfazna fluorescentna *in situ* hibridizacija) uradiće se ispitivanje prisustva hromozomskih abnormalnosti: dodatnih kopija hromozoma 1q21, del17p, t(4;14), i t(14;16). Analiza će se raditi iz uzorka mononuklearnih ćelija kostne srži bolesnika (6-10 ml), na selektovanoj populaciji CD138+ plazmocita. Separacija malignih plazmocita će se vršiti pomoću CD138 magnetnih partikula, prema preporukama proizvođača (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Suspenzija izolovanih plazmocita će se nanositi na mikroskopska stakla, na kojima će se potom primijeniti FISH protokol za analizu interfaznih jedara [43]. Prisustvo aberacija će se utvrđivati analizom 100 ili više interfaznih jedara, za svaki ispitivani genski region. Analiza jedara će se vršiti pomoću mikroskopa OlympusBX51 opremljenog fluorescentnom lampom i pojedinačnim band pass filterima. Slikanje fluorescentnih signala je omogućeno Olympus U-CMAD3 fluorescentnom kamerom (Olympus, Germany), povezanom sa Cytovision programom za obradu slika. FISH proba za detekciju aberacija regiona 1q21 je

koktel proba koja sadrži 2 genska lokusa (CDKN2C/CKS1B) i omogućava detektovanje delecije regiona 1p32 (obilježeno zelenom bojom), kao i dodatka i amplifikacije 1q21 (obilježeno narandžastom bojom). U slučaju prisutne jedne dodatne kopije regiona 1q21 detektuju se 3 narandžasta signala, a u slučaju prisutne amplifikacije 1q21 regiona detektuju se 4 ili više narandžastih signala.

Statistička analiza

Pored deskriptivnih analiza, aritmetička sredina i standardna devijacija će se koristiti za parametrijske podatke, medijana za deskripciju neparametrijskih podataka. Kao parametarski analitički model primjenjivaće se Studentov T-test, a neparametrijski: Pearson test, χ^2 test, Fisherov test. Veza između kliničkih parametara i citogenetskih karakteristika procijenit će se Spearman-ovom korelacijom. Pratiće se odgovor na liječenje i ukupno preživljavanje pacijenata (OS). Kaplan-Meier metod će se koristiti za analizu ukupnog preživljavanja. Long rank testom eveluirat će se značaj analiziranih parametara na ukupno preživljavanje. Korišćenjem Cox-ovog proporcionalnog hazardnog modela određivat će se nezavisni prognostični parametri na dužinu preživljavanja. Koristiće se statistički informacioni softverski sistem, SPSS verzija 22.0. Definisan je nivo statističke značajnosti: visoko statistički značajna povezanost- $p < 0.01$, statistički značajna povezanost $p < 0.05$.

Očekivani naučni doprinos

Utvrđivanje prognostičkog značaja navedenih molekularno-genetičkih abnormalnosti na tok i ishod multiplog mijeloma, omogućit će definisanje mogućih mehanizama rezistencije u ovoj bolesti sa direktnim kliničkim uticajem na adekvatan terapijski pristup. Identifikacija bolesnika sa nepovoljnim prognostičkim profilom, uključujući kliničke i specifične molekularne činioce kao što je amp1q21, omogućila bi u budućnosti individualni terapijski pristup i ranu primjenu inovativnih vidova liječenja kao što je imunološka terapija poput monoklonskih antitijela, bispecifičnih antitijela i CAR T ćelija. Ovo istraživanje bi ukazalo na značaj uvođenja molekularnih prognostičkih faktora u nove prognostičke modele, u cilju rane detekcije visoko rizičnih bolesnika, izbora optimalne terapije i poboljšanja krajnjeg ishoda liječenja.

Spisak objavljenih radova kandidata

1. Zaric E, Ratip S, Kizikilic E, Djurovic M. CNS Toxoplasmosis in haploidentical bone marrow transplant recipient: Case report of successful treatment. Turkish journal of hematology, volume 36, Issue 1, supplement 1, March 2019, P-045.
2. Zaric E, Popovic A. Pregnancy outcomes in a case of protein S deficiency carriers couple. Leukemia research, volume 71, supplement 1, October 2018: PP42 (S48)
3. Zaric E, Todorovic M, Popovic A, Mihaljevic B, Kraguljac N. Predictive markers of mantle cell lymphoma in leukemic phase. Leukemia research, volume 49, supplement 1, October 2016: PP10 (S22)
4. Zaric E, Popovic A, Todorovic M, Mihaljevic B, Kraguljac N. Rare presentation of follicular lymphoma with peripheral blood involvement: clinical characteristics and outcome. Leukemia research, volume 49, supplement 1, October 2016: PP11 (S23)
5. Zaric E. Therapy approach of rare kidney extramedullary plasmacytoma. Leukemia research, volume 49, supplement 1, October 2016: PP09 (S22)
6. Zaric E, Todorovic M, Popovic A, Mihaljevic B, Kraguljac N. Marginal Zone Lymphoma in leukemic phase: clinical characteristics and prognosis. Leukemia research, volume 39, supplement 2, October 2015: PP-099 (S28)