

НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

"Разлика у имунофенотипским и функционалним карактеристикама лимфоцита лимфних чворова стражара оболелих од меланома коже у првом и другом стадијуму болести"

Кандидат: др Емилија Филиповић

Одлуком Наставно научног већа Медицинског факултета у Београду од 10.07.2025. године, под бројем: 21/VI-3/1-ЕФ именована је Комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације "Разлика у имунофенотипским и функционалним карактеристикама лимфоцита лимфних чворова стражара оболелих од меланома коже у првом и другом стадијуму болести" кандидата др Емилија Филиповић, у саставу:

Име и презиме члана комисије	Звање	Научна област	Установа у којој је запослен
др Срђан Николић	Професор	општа хирургија, онкологија	МФУБ, Институт за онкологију и радиологију Србије
др Иван Марковић	Професор	општа хирургија, онкологија	МФУБ, Институт за онкологију и радиологију Србије
др Марија Матић	Професор	медицинска биохемија	МФУБ, Институт за клиничку и медицинску биохемију
др Ана Вулетић	Виши научни сарадник	имунологија, онкологија	Институт за онкологију и радиологију Србије
др Марко Спасић	Професор	општа хирургија, онкологија	Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу, УКИЦ Крагујевац

Име и презиме ментора	Звање	Научна област	Установа у којој је запослен
др Милан Жегарац	Доцент	општа хирургија, онкологија	МФУБ
др Катарина Мирјачић Мартиновић	Виши научни сарадник	имунологија, онкологија	Институт за онкологију и радиологију Србије

На основу анализе приложене документације у вези са темом предложене докторске дисертације, након разговора са кандидатом, а према критеријумима за процену научне заснованости теме докторске дисертације, чланови Комисије подносе Наставно научно већу Медицинског факултета у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Подаци о кандидату:

Емилија Филиповић, рођена је 04.10.1986. године у Београду. Уписала је Медицински факултет Универзитета у Београду 2005. године. Дипломирала је у фебруару 2012. године са просечном оценом током студирања 8,81. Од 2013. године је запослена на Институту за онкологију и радиологију Србије, а од 2014. је у сталном радном односу. Специјалистичке студије из области опште хирургије уписала је 2014. године на Медицинском факултету у Београду, а завршни специјалистички испит положила је са одличним успехом у јануару 2021. год. Докторске студије на смеру „Биологија тумора и оксидативна обољења“ уписала је 2017. године на Медицинском факултету у Београду. Супруга је и мајка је два дечака.

Б. Списак публикованих радова кандидата објављених у целини

1. Jevric M, Filipovic E, Krivokuca A. Genetic analysis of multiple primary cancers: A case report. Medicinski pregled. Jan 2020; 73(5-6):170-174.
2. Dunjic S, Pejic J, Filipovic E et al. Laboratory findings in twins suffering from autism – Case report. J oh Health Science. Jun 2019; 7(4): 239-245.
3. Dunjic S, Pejic J, Filipovic E et al. Multidisciplinary holistic assessment in diagnosis and therapy of autism. J of Health Science. Dec 2018; 6(6): 446-448.

Ц. ОБРАЗЛОЖЕЊЕ ТЕМЕ:

1. НАУЧНА ОБЛАСТ:

МЕДИЦИНА (онкологија)

2. ПРЕДМЕТ РАДА:

Предмет рада ће бити да се у ткиву лимфних чворова стражара (ЛЧС) пацијената оболелих од меланома коже у I и II клиничком стадијуму одреди и упоређи проценат укупних CD3+ Т лимфоцита и њихових субпопулација (CD3+CD4+ помоћнички, CD3+CD8+ цитотоксични, CD25+Foxp3+CD4+ регулаторни Т лимфоцити), као и проценат CD3-CD56+ НК ћелија, као и да се одреди и упоређи функција укупних CD3+ Т лимфоцита, мерењем експресије синтетисаног интерферона-гама (ИФН-γ) у њима. Поред тога код ових пацијената у ЛЧС одређиваће се и упоређивати експресија контролних тачака имунског одговора, инхибиторних молекула, рецептора програмиране ћелијске смрти 1 (енгл. *Programmed Death 1 receptor*, ПД-1), гена 3 активације лимфоцита (енгл. *Lymphocyte-Activation Gene 3*, ЛАГ-3) и Т-ћелијског рецептора 3 који садржи имуноглобулин и муцин (енгл. *T cell immunoglobulin and mucin domain containing-3*, ТИМ-3), на површини укупних CD3+ Т лимфоцита, као и повезаност процента CD3+CD8+ и CD3+ПД-1+ Т лимфоцита са патохистолошким карактеристикама примарног тумора (хистолошки тип, дебљина тумора (Бреслоу)).

3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА:

1. Одредити и упоредити заступљеност укупних CD3+ Т лимфоцита и њихових субпопулација (CD3+CD4+ помоћнички, CD3+CD8+ цитотоксични, CD25+Foxp3+CD4+ регулаторни Т лимфоцити), као и CD3-CD56+ НК ћелија, у ткиву ЛЧС пацијената оболелих од меланома коже у I и II клиничком стадијуму.
2. Одредити и упоредити функцију укупних CD3+ Т лимфоцита у ткиву ЛЧС пацијената оболелих од меланома коже у I и II клиничком стадијуму, мерењем експресије синтетисаног ИФН-γ у њима.
3. Одредити и упоредити експресију ПД-1, ЛАГ-3 и ТИМ-3 молекула на површини укупних CD3+ Т лимфоцита у ткиву ЛЧС пацијената оболелих од меланома коже у I и II клиничком стадијуму.
4. Одредити и упоредити повезаност процента CD3+CD8+ и CD3+ПД-1+ Т лимфоцита у ткиву ЛЧС пацијената оболелих од меланома коже у I и II клиничком стадијуму са патохистолошким карактеристикама примарног тумора (хистолошки тип, дебљина тумора (Бреслоу)).

4. ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА:

У ткиву ЛЧС болесника у II клиничком стадијуму меланома коже смањена је заступљеност и функција укупних CD3+ Т лимфоцита, као и заступљеност цитотоксичних CD3+CD8+ Т ћелија, а такође је повећана експресија ПД-1, ЛАГ-3, ТИМ-3 молекула на укупним CD3+ Т лимфоцитима у односу на пацијенте у I клиничком стадијуму.

5. МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА:

У овој ретроспективно-проспективној студији користиће се узорци ткива ЛЧС 60 пацијената са кожным, локализованим меланомом, старости преко 18 година, без обзира на расу, пол или етничко порекло, који ће бити подвргнути биопсији ЛЧС у Институту за онкологију и радиологију Србије (ИОРС), Планирани период истраживања је 18 месеци, од априла 2024. године до октобра 2025. ЛЧС се у дијагностици рутински анализирају на присуство ћелија меланома у њима код пацијената који имају меланоме дебљине по Бреслоу $\geq 0,8$ мм или тање али са присутном улцерацијом (стадијум T1b и виши према ТНМ класификацији тумора), а немају клинички и дијагностички уочене знакове патолошке лимфаденопатије и/или метастатских промена. Из истраживања ће бити искључени пацијенти старости испод 18 година, као и пацијенти оболели од инфективних обољења, аутоимунских болести, акутне или хроничне инфламације другог порекла. Информисани писмени пристанак ће бити тражен од сваког пацијената на основу протокола који је одобрио Етички одбор ИОРС-а (бр.14/2024/1081). Ради хируршке интервенције која има за циљ проверу ЛЧС, преоперативно на дан операције, интрадермално у регију ожиљка од уклоњеног меланома, биће убризган маркер, радиоактивни изотоп (Ti^{99m}), а непосредно преоперативно и други маркер, витална боја (метилен плава), на исти начин. У току хируршке интервенције ће из регионалног лимфног базена бити одстрањен лимфни подус који је примио један или оба маркера, чиме се сматра да је он ЛЧС. ЛЧС су или позитивни или негативни на ћелије меланома на основу патохистолошке анализе серијских пресека бојењем хематоксилином и созином (ХЕ) и имунохистохемијским бојењем. У случају позитивног ЛЧС, пацијенти се сврставају у III стадијум болести, а у случају негативног ЛЧС у I или II стадијум у зависности од дебљине примарног меланома и присутне улцерације. Насумични део ЛЧС (1 мм највеће дебљине пресека) од сваког пацијента, добијен свеж од стране патолога у току или одмах након операције, ће бити пребачен у криовајле и криопрезервиран на $-150^{\circ}C$ ради складиштења и касније обраде. За потребе овог истраживања искључиво ће се анализирати ЛЧС негативни на ћелије меланома (клинички стадијум I и II). Анализа имунофенотипских и функционалних карактеристика лимфоцита из добијеног узорка ЛЧС вршиће се у Одсеку лабораторије за имунологију Службе за научноистраживачку и образовну делатност ИОРС-а.

Ткиво ЛЧС ће бити механички иситњено у хранљивој подлози за ћелијску културу, а затим потискивањем кроз мрежицу биће добијена једноћелијска суспензија. Из добијене суспензије ћелија на густинском градијенту биће изоловане мононуклеарне ћелије (МНЋ). Процентуална заступљеност укупних Т лимфоцита и њихових различитих субпопулација, као и проценат НК ћелија и инхибиторних рецептора, ПД-1, ЛАГ-3, ТИМ-3, на површини укупних Т ћелија у популацији лимфоцита у свеже изолованим МНЋ пореклом из ЛЧС оболелих од меланома коже одређиваће се методом директне троколонне имунофлуоресценције на проточном цитометру, *FACSCalibur*, коришћењем моноклонских антитела обележених флуоресцентним бојама. Лимфоцити ће се детектовати у суспензији МНЋ према својој величини и грануларности у *CellQuest* програму, а степен неспецифичне имунофлуоресценције одређиваће се коришћењем изотипски идентичних, ирелевантних, контролних моноклонских антитела и одузимати од флуоресценције узорка. У раду ће бити коришћене следеће комбинације моноклонских антитела која су обележена флуоресцентним бојама: ЦД8ФИТЦ/ЦД4ПЕ/ЦД3АПЦ, ЦД56ФИТЦ/ЦД11БЕ/ЦД3АПЦ, ЛАГ-3ФИТЦ/ТИМ-3ПЕ/ЦД3АПЦ, ЦД25ФИТЦ/Фоксп3ПЕ/ЦД4ПерЦП. Укупни Т лимфоцити ће бити детектовани и анализирани као ЦД3+ лимфоцити, помоћнички Т лимфоцити као ЦД3+ЦД4+, цитотоксични Т лимфоцити као ЦД3+ЦД8+, а НК ћелије као ЦД3-ЦД56+ лимфоцити. Експресија ПД-1, ЛАГ-3 и ТИМ-3 молекула ће бити одређивана на површини укупних ЦД3+ Т лимфоцита. Анализа процента регулаторних Т (Трег) лимфоцита унутар популације лимфоцита ЛЧС вршиће се такође методом проточне цитометрије. Спољашњи антигени који одређују имунофенотип Трег ћелија биће обележени моноклонским антителима коњугованим флуоресцентним бојама, ЦД25ФИТЦ и ЦД4ПерЦП. После бојења спољашњих антигена, према стандардном поступку за премеабилитацију, талог МНЋ ће бити излаган дејству раствора за пермеабилитацију ћелија који садржи детергент сапонин и након тога за обележавање унутарћелијског Фоксп3 сваком узорку ће бити додавано анти-Фоксп3ПЕ моноклонско антитело. У популацији лимфоцита ЛЧС проценат Трег ће бити анализиран као проценат ЦД4+ЦД25+ Т ћелија које садрже Фоксп3.

За одређивање присуства синтетисаног ИФН- γ у ЦД3+ Т ћелијама користиће се такође метода проточне цитометрије. Припремљен узорак МНЋ изолованих из ЛЧС болесника са меланомом биће у култури излаган дејству форбол-12-миристат-13-ацетата (ПМА) и јономицина који имају улогу да стимулишу синтезу ИФН- γ . Након 1 сат инкубације са ПМА и јономицином додаће се брефелдин А да би се спречио транспорт синтетисаних протеина из ћелија у спољашњу средину. Након додатних 3 сата (укупно 4 сата третмана), МНЋ ће бити додато моноклонско антитело коњугованог са флуоресцентном бојом, ЦД3ФИТИЦ, које везује спољашњи антиген који одређује имунофенотип укупних Т лимфоцита. Након бојења спољашњег антигена, талог МНЋ ће бити излаган дејству раствора за пермеабилизацију и након тога за облежавање унутарћелијског ИФН- γ сваком узорку ће бити додавано анти-ИФН- γ ПЕ моноклонскоо антитело. У популацији лимфоцита ЛЧС, одређиваће се проценат ЦД3+ Т ћелија које садрже ИФН- γ .

У овом истраживању потребна величина узорка за детекцију величине ефекта од 0.41 у анализи варијансе са две групе за нумеричке варијабле: проценат ЦД3+ Т лимфоцита, проценат ЦД3+ЦД8+ цитотоксичних Т лимфоцита, проценат ЦД3+ЦД-1+ ћелија, за ниво статистичке значајности од 0.05 и статистичку снагу од 0.8 износи 50. Величина ефекта добијена је на основу претпостављених односа вредности објашњене и резидуалне варијансе од 0.15 према 0.9. Израчунавање величине узорке урађено је помоћу програма *G-power 3.1.6*. Добијени резултати ће се анализирати применом параметарског Т теста за независне узорке, *Unpaired T test* и непараметарског теста, *Mann-Whitney exact test of unpaired data* коришћењем *GraphPad Prism* програма. Корелације између података одређиваће се *Spearman* ранговном корелацијом. Разлике између упоређиваних група биће статистички значајне односно постојаће корелација уколико ће израчуната п вредност бити мања или једнака 0,05.

6. ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ:

Како ћелије меланома ослобађају бројне инхибиторне факторе и пацијенти са кожним, локализованим меланомом са интактним, неметастатским ЛЧС и то пре свега у II клиничком стадијуму могу да имају измењене бројне функције ћелија имунског система очекује се да ови пацијенти имају смањену заступљеност и функцију укупних ЦД3+ Т лимфоцита, као и смањену заступљеност цитотоксичних ЦД3+ЦД8+ Т ћелија, а такође повећану експресију ПД-1, ЛАГ-3, ТИМ-3 молекула на укупним ЦД3+ Т лимфоцитима у односу на пацијенте у I клиничком стадијуму.

7. НАУЧНИ ДОПРИНОС:

У литератури је мало података о имунофенотипским и функционалним карактеристикама ћелија имунског одговора у још увек интактном, неметастатском ЛЧС болесника са кожним, локализованим меланомом. Из тог разлога би ово истраживање требало да да сасвим нове податке везане за потенцијалну разлику у проценту и функцији Т лимфоцита, као и експресији инхибиторних молекула, контролних тачака имунског одговора, ПД-1, ЛАГ-3, ТИМ-3 на њиховој површини између болесника у клиничком стадијуму II са лошијом прогнозом и већом могућношћу метастазирања у односу на пацијенте у клиничком стадијуму I. Иако је неколико година уназад одобрена примена моноклонских антитела која блокирају ПД-1 молекула у високоризичним подгрупама пацијената у II стадијуму болести (ПБ/Ц), у виду адјувантне терапије, остаје отворено питање да ли су сви ови пацијенти кандидати за лечење овом терапијом, с обзиром на њене потенцијалне нежељене ефекте и могућу резистенцију. Резултати овог истраживања могли би да допринесу прецизнијем одабиру пацијената код којих би ова терапија дала најбољи клинички одговор, а такође би резултати који се односе на испољавање не само ПД-1, већ и мање анализираних ЛАГ-3 и ТИМ-3 инхибиторних молекула на површини лимфоцита ЛЧС могли да покажу њихов значај у смањену функције Т лимфоцита, као и потенцијално велики значај њихове терапијске блокаде код пацијената са високим ризиком метастазирања у II стадијуму болести.

8. СПИСАК КОРИШЋЕНЕ ЛИТЕРАТУРЕ:

1. Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, Tucci M, Silvestris F. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget*. 2017;8:106132-106142.
2. Melanom: prevencija, dijagnostika i lečenje: nacionalni vodič. Radna grupa Ministarstva zdravlja za izradu vodiča dobre kliničke prakse za melanom; urednici Novaković M i dr. Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva: Intereskijski odbor za melanom Srpskog lekarskog društva. 2019.
3. Michielin O, van Akkooi ACJ, Ascierto PA, Dummer R, Keilholz U. ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019;30:1884-1901.
4. Pathak S, Zito PM. Clinical Guidelines for the Staging, Diagnosis, and Management of Cutaneous Malignant Melanoma. [Updated 2023 Jun 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-.
5. Lund AW. Lymph node metastasis: An immunological burden. *J Exp Med*. 2023;220:e20230904.
6. Delclaux I, Ventre KS, Jones D, Lund AW. The tumor-draining lymph node as a reservoir for systemic immune surveillance. *Trends Cancer*. 2024;10:28-37.
7. du Bois H, Heim TA, Lund AW. Tumor-draining lymph nodes: At the crossroads of metastasis and immunity. *Sci Immunol*. 2021;6:eabg3551.
8. Suman S, Markovic SN. Melanoma-derived mediators can foster the premetastatic niche: crossroad to lymphatic metastasis. *Trends Immunol*. 2023;44:724-743.
9. Dhanyamraju PK, Patel TN. Melanoma therapeutics: a literature review. *J Biomed Res*. 2022;36:77-97.
10. Shah V, Panchal V, Shah A, Vyas B, Agrawal S, Bharadwaj S. Immune checkpoint inhibitors in metastatic melanoma therapy (Review). *Med Int (Lond)*. 2024;4:13.

11. Amaral T et al. ESMO Guidelines Committee. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up☆. Annals of Oncology. 2025;36:10-30.
12. Lund AW. Immune Potential Untapped: Leveraging the Lymphatic System for Cancer Immunotherapy. Cancer Immunol Res. 2022;10:1042-1046.
13. Lee R, Mandala M, Long GV, Eggermont AMM, van Akkooi ACJ, Sandhu S, Garbe C, Lorigan P. Adjuvant therapy for stage II melanoma: the need for further studies. Eur J Cancer. 2023;189:112914.
14. Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. Expert Rev Anticancer Ther. 2018;18:775-784.
15. Jackson A, Warner N. Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes, 3 edition.. In : Rose N., Friedmah H., Fahey J. Manual of Clinical Laboratory Immunology. Washington DC : American Society for Microbiology, 1986 .

Д. ЗАКЉУЧАК

На основу анализе приложене документације, чланови комисије сматрају да је предложена тема докторске дисертације "Разлика у имунофенотипским и функционалним карактеристикама лимфоцита лимфних чворова стражара оболелих од меланома коже у првом и другом стадијуму болести" кандидата др Емилије Филиповић значајна и актуелна и да у потпуности испуњава услове за оригиналан научни допринос у истраживањима која се односе на детаљније сагледавање карактеристика ћелија имунског одговора у неметастатском лимфном чвору стражару болесника са меланомом коже у I и II клиничком стадијуму болести, као и на њихов потенцијални значај при избору терапије.

Досадашњи стручни и научни рад кандидата др Емилије Филиповић, али и ментора¹, доц. др Милана Жегарца и ментора² ВНС др Катарине Мирјачић Мартиновић, као и актуелност предложене теме, представљају реалну основу да ће истраживање бити извршено компетентно и на савремен начин.

Стога, на основу целокупне анализе приложеног материјала, Комисија једногласно закључује да су, поред законских, испуњени и сви остали формални услови и на основу тога предлаже Научном већу Медицинског факултета да кандидату др Емилији Филиповић одобри израду докторске дисертације са предложеном темом.

Комисија:

Београд, 29.07.2025. године

1. Проф. др Срђан Николић

2. Проф. др Иван Марковић

3. Проф. др Марија Матић

4. ВНС др Ана Вулетић

5. Проф. Др Марко Спасић