



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ Скопје



ЗАВРШЕН ИЗВЕШТАЈ	
ЗА ПРОЕКТ ОД МИНИСТЕРСТВО ЗА ОБРАЗОВАНИЕ И НАУКА	
1. Корисник: Универзитет „Св.Кирил и Методиј“ во Скопје, Фармацевтски факултет	
Адреса: Мајка Терез 47, 1000 Скопје	
Телефон: +3892326032	
Е-адреса: contact@ff.ukim.edu.mk	
Веб-страница: www.ff.ukim.edu.mk	
2. Наслов на проектот	
Воведување на нова метода за одредување на ниска концентрација на соматски мутации со употреба на течна биопсија и dPCR	
3. Предмет (се опишува предмет на договорот)	Одлука за финансирање на проекти од Министерство за образование и наука: 0815590/5 од 15.11.2021 Договор: архивски број од Фармацевтски факултет 09-555/7 од 19.11.2021г. (МОН бр. 15-15590/40 од 21.11.2021г.) помеѓу договорни страни Министерство за образование и наука и Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје Предмет: воведување на нови стандардни аналитички постапки од областа на молекуларна биологија, генетика и фармакогенетика со употреба на набавена опрема апарат за дигитална полимераза верижна реакција (dPCR)
4. Вкупен буџет на проектот	12.000.000 денари реализирани: 9.322.000 денари
5. Вкупно средства одобрени од МОН (65%)	7.800.000 денари реализирани: 6.059.300 денари
6. Вкупно средства обезбедени од други извори (35%)	4.200.000 денари реализирани: 3.262.700 денари
7. Место на реализација на проектот	8. Времетраење на проектот
Центар за биомолекуларни фармацевтски анализи, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј“ во Скопје	15.11.2021-31.10.2023
9. Главен истражувач на проектот (да се наведе име и презиме)	
Проф. д-р. Надица Матевска-Гешковска	
10. Други соработници вклучени во проектот (да се наведе име и презиме и тип на соработник)	



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ Скопје



Во реализација на проектот беа вклучени вкупно 14 соработници, од кои 11 соработници предвидени во проектната апликација, а во текот на проектот дополнително се ангажирани 2 соработници кои се вработени на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје и 1 лице (млад истражувач) дополнително ангажирано за реализација на активностите предвидени во рамки на проектот:

- Раководител и главен истражувач: проф. д-р. Надица Матевска Гешковска, вонреден професор на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје
- Истражувачи (6): акад. проф. д-р Александар Димовски, редовен професор на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје; проф. д-р. Љубица Шутуркова, редовен професор на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје; проф. д-р. Зоран Стерјев, редовен професор на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје; проф. д-р. Александра Грозданова, редовен професор на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје; проф. д-р. Александра Капедановска-Несторовска, вонреден професор на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје и проф. д-р. Зорица Наумовска, вонреден професор на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје
- Млади истражувачи (6): д-р. Марија Станинова Стојовска, стручен соработник за подршка на Центар за биомолекуларни фармацевтски анализи, Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје; м-р. фарм. Елизабета Крстевска-Божиновиќ, асистент на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје; м-р. фарм. Евгенија Михајлоска, асистент на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје; м-р. фарм. Александар Димковски, асистент на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје; дипл. лаб. биоинж. Емилија Ѓоргиевска, соработник за подршка на Центар за биомолекуларни фармацевтски анализи, Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје и дипл. инж. биол. Ангела Јосковска, волонтер дополнително ангажирана за реализација на активностите предвидени во рамки на проектот.
- Технички персонал – лаборант: мед. лаб. тех. Катерина Костова, самостоен референт во Центар за биомолекуларни фармацевтски анализи, Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје

Младите истражувачи м-р. фарм. Елизабета Крстевска-Божиновиќ; м-р. фарм. Евгенија Михајлоска и м-р. фарм. Александар Димковски се студенти на трет циклус докторски студии на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје, дипл. лаб. биоинж. Емилија Ѓоргиевска е студент на втор циклус магистерски студии по лабораториска анализа и инженерство во фармацијата на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје, а дополнително ангажираниот млад истражувач дипл. инж. биол. Ангела Јосковска е студент на втор циклус магистерски студии по биологија-молекуларна биологија, на Природно Математички Факултет, УКИМ, Скопје.

11. Наративен извештај (резиме, опис на реализираните активности, цели и постигнати резултати,)

Кратко резиме на проектот:

Проектот насловен Воведување на нова метода за одредување на ниска концентрација на соматски мутации со употреба на течна биопсија и dPCR се одвиваше во рамките на проектираната временска рамка и во согласност со предвидените цели и резултати со јасни и мерливи индикатори.



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ Скопје



Во рамките на овој проект е набавена напредна и модерна опрема која се одликува со највисока специфичност, точност, прецизност и робусност од сите постоечки методи во моментот. Со тоа беше направено видно унапредување на капацитетите на Центарот за биомолекуларни фармацевтски анализи (ЦБФА), Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје, кое овозможи и проширување на опсегот на апликативна и научно-истражувачка работа, преку воведување на нови методи за одредување на ниска концентрација на соматски мутации во вонклеточна туморска ДНК изолирана од плазма со употреба на течна биопсија и дигитална полимераза верижна реакција (dPCR) и следење на минимална резидуална болест и појава на мутации на резистенција по генетски таргетирана терапија (главно кај пациенти со карцином на бели дробови и колоректум). Сепак, согласно диверзитетот на потенцијални апликации од областа на молекуларна биологија, генетика и фармакогенетика за кои може да се употреби набавената опрема, таа ќе биде искористлива и за истражувачки проекти вон потесното поле на интерес на ЦБФА. Тоа, несомнено ќе овозможи и продлабочување и проширување на научните знаења при едукација на млади истражувачи/докторанди и надворешни истражувачи, кои ќе можат да добијат практични знаења од напредна технологија која до сега била достапна само на еминентни универзитети во странство.

Краток опис на реализирани активности во однос на обврските предвидени со договорот:

1. Со средствата добиени во рамки на проектот наменски е набавен инструмент за дигитална полимераза верижна реакција QuantStudio Absolute Q Digital PCR System, производител ThermoFisher Scientific. Финансискиот извештај е даден на крајот од овој извештај. Опремата набавена со средствата од проектот е воведена во книговодствената евиденција согласно Законот за сметководство на буџетите и буџетските корисници и подзаконските акти (прилог Изјава за научно-истражувачки проект од посебен и јавен интерес (поддршка за развој на лабораториски ресурси) бр. XXXXXX).
2. Развиени се, валидирани и воспоставени четири аналитички постапки за детекција и квантификација на: мутација на резистенција кон EGFR-TKI (с.2369C>T, p.T790M во EGFR генот), два типа на мутации за сензитивност кон терапија со EGFR-TKI (с.2573T>G, p.L858R и мали делеции во егзон 19 од генот EGFR) и мутации во кодоните 12 и 13 во вториот егзон на генот KRAS (с.35G>A p.G12D, с.35G>T p.G12V, с.34G>T p.G12C, с.35G>C p.G12A, с.34G>C p.G12R, с.38 G>A p.G13D, с.38G>T p.G13V, с.37G>C p.G13R).
3. Обезбеден е сертификат за ново воведените аналитички постапки од надворешна контрола на квалитет на резултатите од организација специјализирана за лаборатории кои изведуваат генетски тестирања (EMQN - European molecular genetics quality network, Manchester, UK).
4. Во рамки на услугите кои ги врши Центарот за биомолекуларни фармацевтски анализи воведени се анализите „детекција на мутации кои доведуваат до резистенција кон терапија со течна биопсија и dPCR“, „следење на ниво на мутација по администрација на таргетирана терапија со течна биопсија и dPCR“ и „следење на ниво на мутација по администрација на таргетирана терапија со течна биопсија и dPCR- за ретки мутации со вклучен дизајн на есеј“. Ценовникот на Центарот како анекс на Правилникот за работа на центрите на Фармацевтскиот факултет во Скопје, во состав на Универзитетот „Св. Кирил



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ Скопје



и Методиј“ во Скопје е објавен во Универзитетски гласник бр. 624 од 21.10.2022 и достапен на интернет страната на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје (www.ff.ukim.edu.mk).

5. Поднесено е барање до Фондот за здравствено осигурување на Република Северна Македонија (ФЗОРСМ) за воведување на нова анализа во Ценовникот за здравствени услуги во специјалистичко консултативна здравствена заштита – молекуларна дијагностика (бр.14-493/1 од 20.06.2023). Предлогот е прифатен од страна на ФЗОСМ и новата анализа е додадена под шифра МОЛ436 (Одлука за изменување и дополнување на одлуката за утврдување на референтните цени во специјалистичко консултативна здравствена заштита, Службен весник на РСМ бр.165 од 03.08.2023)
6. Започнати се научно-истражувачки проекти со користење на набавената опрема со Универзитетската клиника за Хематологија и Универзитетската клиника за радиотерапија и онкологија, Скопје.
7. Опремата која е набавена во рамки на овој проект се користи за едукативни цели во рамки на наставата од трет циклус докторски студии од областа Фармација и студии од прв циклус дипломиран лабораториски биоинжењер.
8. Опремата која е набавена во рамки на овој проект ќе биде достапна и отворена за цела научна и академска заедница и за други заинтересирани лица кои имаат потреба од користење на опремата за научно-истражувачки цели, по преференцијални цени за потребната услуга на принцип на покривање на материјални трошоци и техничко работење на наведената опрема (прилог Изјава за преференцијални цени на услуги за научно-истражувачки проект од посебен и јавен интерес (поддршка за развој на лабораториски ресурси) бр. XXXXXX).
9. Согласно договорот планирана е јавна презентација на проектот која ќе биде одржана на **07.12.2023 год.** на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје. Информацијата за истата ќе биде објавена на веб страната на Фармацевтскиот факултет - www.ff.ukim.edu.mk.
10. Финалниот извештај на проектот ќе биде поставен на веб страната на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје во предвидениот временски рок. Истиот ќе биде достапен на следниот линк: www.ff.ukim.edu.mk

Цели и мерливи индикатори за постигнати резултати согласно проектната апликација

Табеларниот приказ на поставените цели, активности за реализација на целите и индикатори за следење на реализацијата кој беше наведен во проектната апликација е даден во Табела 1.

Табела 1. Цели, активности за реализација на целите и индикатори за следење на реализацијата



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ Скопје



Цели / активности за реализација на целта	Индикатор за следење на реализацијата (И)
1. Цел: набавка на опрема – систем за дигитална полимераза верижна реакција (dPCR)	
1.1. Резултат: набавена опрема – систем за дигитална полимераза верижна реакција (dPCR)	И1.1.1: изготвување на техничка спецификација и објавување на тендерска постапка И1.1.2: комплетирање на тендерска постапка и нарачка на опрема И1.1.3: набавената опрема е инсталирана во ЦБФА и пуштена во употреба
2. Цел: употреба на набавената опрема во апликативни цели	
2.1. Резултат: дизајн и валидација на нови аналитички постапки (во времетраење на проектот минимум 1 постапка). Планирано е да се воведат нова метода за детекција на мутации на резистенција кон терапија со селективни EGFR тирозинкиназни инхибитори (EGFR-TKI) кај пациенти со карцином на бели дробови.	И2.1.1: воведена нова стандардна аналитичка постапка И2.1.2: обезбедување на сертификат за ново воведената метода од надворешна контрола на квалитет на резултатите од организација специјализирана за лаборатории кои изведуваат генетски тестирања И2.1.1: поднесување на предлог до Фондот за здравствено осигурување на Македонија (ФЗОМ) за воведување на новата метода во Ценовникот за здравствени услуги во специјалистичко консултативна здравствена заштита – молекуларна дијагностика
3. Цел: употреба на набавената опрема во научно-истражувачки цели	
3.1. Резултат: зголемување на научно-истражувачката работа на ЦБФА	ИЗ.1: Започнување со мин. 1 научно-истражувачки проект
3.2. Резултат: проширување на научно-истражувачкиот тим на ЦБФА со млади истражувачи/докторанди. Планирано е да се обезбеди едукација на младите истражувачи со цел стекнување на практични знаења од напредна технологија која до сега била достапна само на еминентни универзитети во странство.	ИЗ.2: Прием на минимум 1 млад истражувач како волонтер или преку авторски договор (напомена: доколку се одлучи за потпишување на авторски договор, авторските хонорари ќе бидат покриени комплетно од сопствени средства на ЦБФА, независно од предложениот проект и без учество на МОН)



3.3. Резултат: обезбедување на пристап до новата опрема за истражувачи од рамки на јавните високо образовни и научно истражувачки установи вон ЦБФА и Фармацевтски факултет

ИЗ.3: Изработка на ценовник со преференцијални цени на услуги (на принцип на покривање само на материјални трошоци) за научно истражувачки и развојни цели во рамки на јавните високо образовни и научно истражувачки установи

Постигнати резултати:

Цел 1: набавка на опрема – систем за дигитална полимераза верижна реакција (dPCR)

Веднаш по формалното започнување на проектот, Фармацевтски факултет ги иницираше активностите поврзани со реализацијата на првата цел на проектот која вклучува набавка на нова капитална опрема - апарат за дигитална полимераза верижна реакција (dPCR). Менаџерскиот тим на Фармацевтски факултет го промени годишниот план за јавни набавки за 2021 година и донесе одлука за спроведување на јавна набавка со отворена постапка со електронска аукција како финална фаза во вредност од 12.000.000,00 денари (одлука бр. 05-760/1 од 26.11.21). Во меѓувреме раководителот/главниот истражувач и дел од истражувачите вршеа истражување на пазарот на инструменти за dPCR, бидејќи производител на таква опрема во Р.С. Македонија не постои. Со истражувањето на пазарот беше утврдено дека во Р.С. Македонија постојат минимум 3 локални застапници на големите светски производители на ваков тип на опрема кои можат да учествуваат во постапка за јавна набавка. беше составена техничката спецификација и тендерска документација за постапката за јавна набавка, а огласот беше објавен на 29.11.2021 (евидентен бр. во БЈН 20556/2021). До крајниот датум за поднесување понуди, беше поднесена само една понуда во вредност од 7.900.000,00 денари (без ДДВ) од економскиот оператор Друштво за трговија и услуги БИОСИСТЕМИ МК ДООЕЛ, Скопје. беше понуден инструмент QuantStudio Absolute Q Digital PCR System (кат.број A52864) од производител ThermoFisher Scientific. По направената евалуација, комисијата за јавни набавки утврди дека понудата е прифатлива и поднесе извештај во кој му предложи на одговорното лице да донесе одлука за најповолна понуда. Согласно направениот извештај, Деканот на Фармацевтски факултет донесе одлука за избор на најповолна понуда (бр. 05-31/1 од 10.01.2022). По истекот на времескиот рок на жалби, беше пристапено кон потпишување на Договор за јавна набавка со најповолниот понудувач и истиот беше потпишан од двете страни на 24.01.2022. По потпишување на договорот, согласно процедурите за нарачка, беше доставено писмено барање за нарачка на инструментот.

Инструментот беше испорачан и инсталиран на 24.03.2022 година (Слика 1). Согласно барањата во тендерската документација беше одржана дводневна обука во периодот од 24-25.03.2022 година. Според протоколот за работа на производителот на инструментот во услови на пандемија, обуката ја следеа 4 лица (макс.број на дозволени лица) кои директно ќе бидат вклучени во изведувањето на анализите или нивна контрола. Обуката вклучуваше: теоретска



подготовка на извршителите на анализите преку powerpoint презентации во првиот ден од дводневната обука и практична работа во текот на вториот ден, при што беа изведени 2 експерименти и беше извршена обработка и толкување на резултатите добиени со овие експерименти.

Опремата набавена со средствата од проектот е воведена во книговодствената евиденција согласно Законот за сметководство на буџетите и буџетските корисници и подзаконските акти (прилог Изјава за научно-истражувачки проект од посебен и јавен интерес (подршка за развој на лабораториски ресурси) бр. XXXXXX).



Слика 1. Набавена опрема, QuantStudio Absolute Q Digital PCR System, ThermoFisher Scientific

Заклучно со ова, беа исполнети сите сегменти од првата зададена Цел (набавка на опрема – систем за дигитална полимераза верижна реакција) во рок соодветен на претпоставените временски рамки за реализација на целите и остварувањето на резултатите наведени во проектната апликација (Индикатори И1.1.1: изготвување на техничка спецификација и објавување на тендерска постапка, И1.1.2: комплетирање на тендерска постапка и нарачка на опрема и И1.1.3: набавената опрема е инсталирана во ЦБФА и пуштена во употреба).

При тоа, во текот на постапка за јавна набавка на инструмент за dPCR беше добиена цена значително пониска цена (7.900.000 денари без ДДВ) во однос на одобрените средства за проектот (12.000.000 ден. финансирани 65% од Буџетот на МОН и 35% со сопствено учество на Фармацевтски факултет). Поради разликите во планираните и реалните трошоци за јавната набавка, до Министерството за образование и наука беше поднесено Барање за пренамена на преостанатите одобрени средства односно Барање за извршување на измена на финансискиот план на проектот (барање бр. 03-232/1 од 14.03.2022 и барање бр. 03-289/2 од 31.03.2022) со цел набавка на уште еден инструмент - автоматски генетски анализатор. Овој тип на предложена распределба на трошоци за набавка на овие апарати не вклучуваше измена на планираните трошоци кој ги покрива МОН и е во согласност со основниот договор за проектот каде 65% од трошоците за набавка на опрема ги покрива МОН, а 35% Фармацевтски факултет. За жал ова барање не беше одобрено од Министерството за образование и наука.

Дополнително, како дел од неговата посета на Фармацевтски факултет, Скопје во рамките на Свечената академија по повод 45 години постоење на Фармацевтски факултет, одржана на



04.04.2022, на Министерот за образование и наука Јетон Шакири му беа претставени активностите во Центарот за Биомолекуларни фармацевтски анализи (ЦБФА). Во текот на оваа посета на Министерот Шакири му беше претставена и новата опрема – инструмент за dPCR, набавена во склоп на овој проект и инсталирана во овој Центар. Беа презентирани предностите на набавената опрема во однос на постоечките лабораториски ресурси во ЦБФА, супериорните перформанси во споредба со други слични техники, огромниот потенцијал за употребливост на набавената опрема во бројни апликативни и научно-истражувачки области, како и планот за воведувањето на конкретни нови методи за одредување на ниска концентрација на соматски мутации со употреба на точна биопсија и dPCR планирани да се изведат во тек на подоцнежните фази од реализацијата на проектот.

Цел 2: употреба на набавената опрема во апликативни цели

Согласно Цел 2 од проектната апликација беше планирано да се воведат една нова метода за детекција на мутации на резистенција кон терапија со селективни EGFR тирозин-киназни инхибитори (EGFR-TKI) кај пациенти со карцином на бели дробови. Пациентите кои се третирани со прва (гефитиниб, ерлотиниб) и втора (афатиниб, дакомитиниб) генерација на EGFR-TKI предоминантно развиваат прогресивна болест по 10-12 месеци од третманот, без разлика што иницијално покажале задоволителен одговор. Оваа прогресија на болеста настанува поради развој на нови мутации за време на терапијата кои не биле присутни во туморот за време на дијагноза, најчесто p.Thr790Met (T790M) во генот EGFR. Раното откривање на развојот на мутации на резистенција, што е можно само со точна биопсија и dPCR, ќе овозможи рационална употреба на скапи биолошки лекови, но и подолго вкупно преживување и повисок квалитет на живот кај самите пациенти преку избор на алтернативен лек сензитивен на стекнатата мутација. За оваа цел, паралелно со изведувањето на финалните фази на реализација на Цел 1, беше започнато со активности за дизајн на нова аналитичка постапка - тест за детекција и квантификација на инхибиторна мутација p.Thr790Met во генот EGFR во плазма (мутација на резистенција кон EGFR-TKI).

Иако во проектната апликација беше наведено дека во времетраење на проектот ќе биде воведена 1 нова стандардна аналитичка постапка, истражувачкиот тим веднаш пристапи кон дизајн и валидација на дополнителни 2 аналитички постапки за детекција и квантификација на мутацијата p.Leu858Arg (L858R) во генот EGFR во плазма и тест за детекција и квантификација на мали делеции во егзон 19 од генот EGFR во плазма. За разлика од мутацијата T790M која е инхибиторна, овие два теста детектираат сензитирачки мутации кои реагираат на терапија со EGFR-TKI и овозможуваат селекција на пациенти кај кои може да се започне со терапија со EGFR-TKI.

По иницијално извршениот дизајн на олигонуклеотиди (прајмери и проби-сонди) беше направена нарачка за нивна синтеза и беа нарачани дополнителни реагенси и потрошен материјал потребни за воведување и изведување на новите аналитички постапки. Исто така беше направена и нарачка на комерцијални стандарди наменети за валидирање на методи со dPCR односно на слободна циркулирачка ДНК-точна биопсија (Табела 2, производител - Horizon



Discovery, UK).

Табела 2. Стандарди користени за валидација на нови аналитички постапки (Horizon Discovery, UK)

ред.бр.	опис	формат	валидирани мутации
1	Multiplex I cfDNA Reference Standard Set (HD780)	cfDNA во плазма 0,1% (HD779) 1% (HD778) 5% (HD777) wt 0% (HD776) 350 ng per vial c=20 ng/ μ l	EGFR L858R EGFR delE746-A750 EGFR T790M EGFR V769-D770insASV KRAS G12D NRAS Q61K NRAS A59T PIK3CA E545K
2	EGFR Multiplex cfDNA Reference Standard Set (HD825)	cfDNA in buffer 0,1% (HD823) 1% (HD822) 5% (HD821) wt 0% (HD824) 350 ng per vial c=20 ng/ μ l	EGFR S464L EGFR G465R EGFR Δ E746 - A750 EGFR S768I EGFR V769 - D770insASV EGFR T790M EGFR L858R EGFR L861Q EGFR G719S EGFR C797S
3	Quantitative Multiplex Reference Standard (HD701)	gDNA 1 μ g c=50 ng/ μ l	BRAF V600E 10,5% KIT D816V 10% EGFR delE746-A750 2% EGFR L858R 3% EGFR T790M 1% EGFR G719S 24,5% KRAS G13D 15% KRAS G12D 6% NRAS Q61K 12,5% PIK3CA H1047R 17,5% PIK3CA E545K 9%

По приемот на реагенсите веднаш беше пристапено кон валидација за трите нови аналитички постапки, иницијално со користење на in-house стандарди – смеси со различен % на туморска ДНК со позната мутација и фреквенција на мутација (одредена со користење на NGS технологија) и нормална ДНК, приготвени во Центарот за биомолекуларни фармацевтски анализи. Сите три анализи дополнително беа валидирани и со употреба на комерцијалните стандарди со кои е потврдена сензитивност од 0,5% VAF. Примери од резултатите се дадени во Слика 2 и 3.

Дополнително, ЦБФА учествуваше и во надворешна контрола на квалитет на резултатите од новововедените три тестови од организација специјализирана за лаборатории кои изведуваат генетски тестирања (EMQN - European molecular genetics quality network, Manchester, UK). Предмет на контрола при ова учество е проверка на точноста на резултатите од генетските тестирања на примероци од пациенти со карцином на бели дробови во примерок од плазма



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ Скопје



(вонклеточна ДНК, течна биопсија) т.е. точност на генотипизација и квантификација (%VAF), но и контрола на клиничкиот извештај базиран на тие резултати т.е интерпретација на резултатите, препораки за терапија, начин на претставување на елементите на извештајот и сл. Во рамките на оваа надворешна контрола, резултатите од употребените методи и нивното толкување од страна на ЦБФА беше оценето со највисок скор/оцена (2 од максимум 2) во сите евалуирани категории: Genotyping (%VAF), Interpretation и Clerical (прилог сертификат).

Согласно наведеното, во рамките на овој проект во ЦБФА, Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје беа воспоставени и валидирани 3 нови стандардни аналитички постапки:

1. тест за детекција и квантификација на инхибиторна мутација p.Thr790Met во генот EGFR која е причина за стекната резистенција на терапија со селективни EGFR тирозин-киназни инхибитори (EGFR-TKI) и е причина за појава на резистенција кај >60% од пациентите со карцином на бели дробови со иницијален одговор на прва и втора генерација EGFR-TKI (сензитивна на трета генерација EGFR-TKI - осимертиниб),
2. тест за детекција и квантификација на сензитирачка мутација p.Leu858Arg во генот EGFR поврзана со одговор кон терапија со EGFR-TKI, т.е. пациентите во чии тумори не е детектирана оваа мутација нема да реагираат на терапија со EGFR-TKI,
3. тест за детекција и квантификација на мали делеции во егзон 19 од генот EGFR, со кој во една анализа можат да се детектираат најразлични типови на мали делеции, кои стандардно се тестираат во засебни анализи. Овој тип на мутации исто така се сензитирачки, односно овозможуваат селекција на пациенти кај кои може да се употребува терапија со EGFR-TKI.

Сите 3 анализи се неинвазивни, бидејќи користат плазма како почитен материјал за изолација на слободна циркулирачка туморска ДНК (течна биопсија). Анализите за p.Leu858Arg и мали делеции во егзон 19 од генот EGFR (бр. 2 и 3) е наменето да се користат кај ново дијагностицирани пациенти со карцином на бели дробови со цел селекција на пациенти кај кои се очекува одговор на терапија со EGFR-TKI, но и за следење на минимална резидуална болест (ниво на мутација) по ординирана терапија. Додека, анализата за p.Thr790Met (бр.1) е наменета да се користи кај пациенти кои имаат прогресија на болеста по иницијален одговор на EGFR-TKI од прва (гефитиниб, ерлотиниб) и втора (афатиниб, дакомитиниб) генерација. Употребата на плазма како материјал за изведување на анализите ги прави погодни за употреба кај пациенти без клиничка слика (пр. при следење на минимална резидуална болест) и пациенти кај кои од технички причини не може да се изведе тенкоиглена биопсија.

Следствено, Ценовникот на ЦБФА беше дополнет со анализите „детекција на мутации кои доведуваат до резистенција кон терапија со употреба на течна биопсија и dPCR“, „следење на ниво на мутација по администрација на таргетирана терапија со употреба на течна биопсија и dPCR“ и „следење на ниво на мутација по администрација на таргетирана терапија со употреба течна биопсија и dPCR- за ретки мутации со вклучен дизајн на есеј“. Ценовникот на Центарот како анекс на Правилникот за работа на центрите на Фармацевтскиот факултет, во состав на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје е објавен во Универзитетски гласник бр. 624 од 21.10.2022 и достапен на интернет страната на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје (www.ff.ukim.edu.mk).



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ Скопје



Сите новововедени анализи имаат иста цена на чинење бидејќи користат иста апаратура и исти реагенси и потрошен материја за dPCR, изолација на вонклеточна ДНК од плазма и имаат еквивалентно времетраење на анализа и потреба од тим на здравствени работници. Цената на чинење на секоја од трите наведени анализи изнесува 14.680ден доколку се работи со течна биопсија и во тој случај ќе биде потребно да се достави примерок од периферна крв (со ЕДТА) вкупно 10mL. Истите анализи можат да се работат и на примерок од свежо ткиво од тенко-иглена биопсија (или FFPE примерок) и во тој случај цената на чинење е пониска, односно изнесува 11.600ден за секоја од анализите.

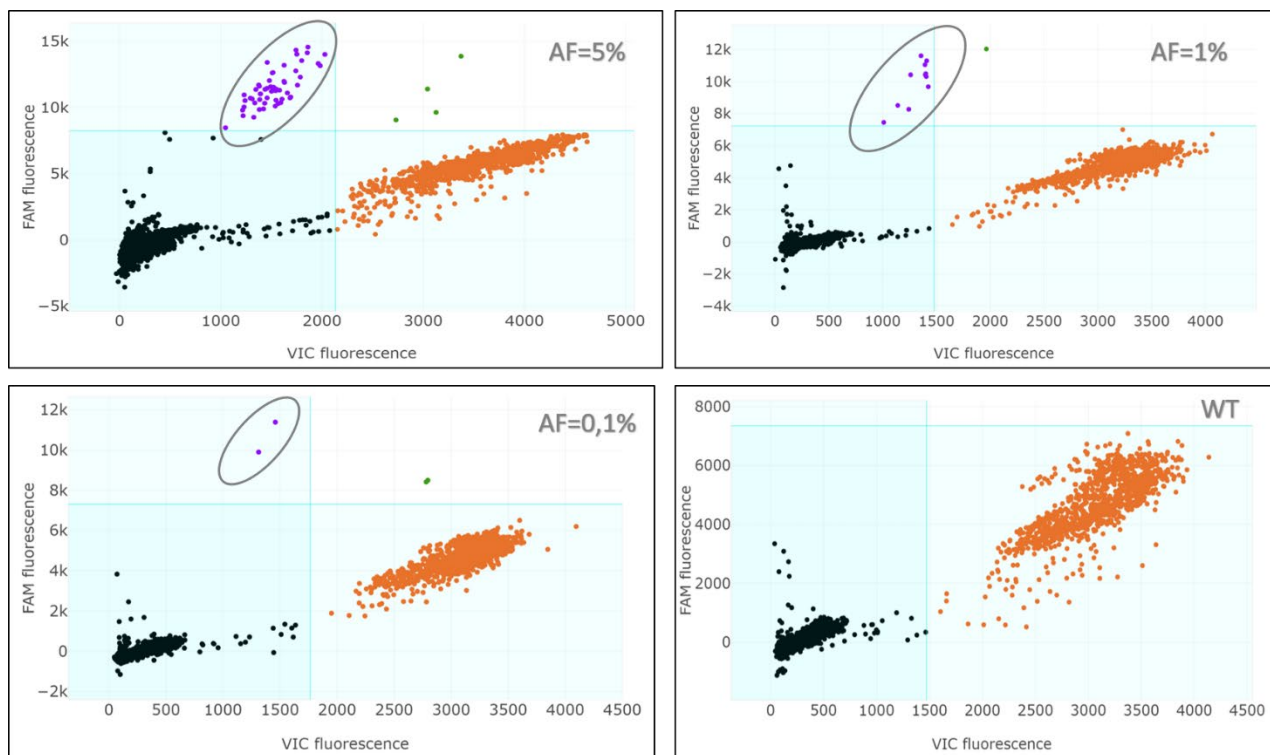
Како последна фаза за реализација на Цел 2 беше поднесено барање до Фондот за здравствено осигурување на Република Северна Македонија (ФЗОРСМ) за воведување на нова анализа во Ценовникот за здравствени услуги во специјалистичко консултативна здравствена заштита – молекуларна дијагностика (бр.14-493/1 од 20.06.2023). Предлогот е прифатен од страна на ФЗОРСМ и новата анализа е додадена под шифра МОЛ436 и опис „Детекција и квантификација на соматски мутации во плазма со dPCR технологија“ и цена на чинење 14.680 денари (Одлука за изменување и дополнување на одлуката за утврдување на референтните цени во специјалистичко консултативна здравствена заштита, Службен весник на РСМ бр.165 од 3.8.2023). Бидејќи, според нашите искуства, очекуваме на годишно ниво да се спроведуваат ~300 анализи за детекција и квантификација на мутации со употребата на dPCR методологија, до ФЗОРСМ беше поднесено и барање за зголемување на договорниот износ за специјалистичко-консултативни здравствени услуги од дијагностичко лабораториска дејност за молекуларна дијагностика за Центарот за биомолекуларни фармацевтски анализи (бр.14-492/1 од 20.06.2023). До моментот на поднесување на завршниот извештај, не е добиен одговор на ова барање.

Заклучно со ова, беа исполнети сите сегменти од втората зададена Цел (употреба на набавената опрема во апликативни цели) во рок соодветен на претпоставените временски рамки за реализација на целите и остварувањето на резултатите наведени во проектната апликација (Индикатори И2.1.1: воведување на нова стандардна аналитичка постапка, И2.1.2: обезбедување на сертификат за ново воведената метода од надворешна контрола на квалитет на резултатите од организација специјализирана за лаборатории кои изведуваат генетски тестирања, И2.1.3 поднесување на предлог до Фондот за здравствено осигурување на Македонија (ФЗОМ) за воведување на новата метода во Ценовникот за здравствени услуги во специјалистичко консултативна здравствена заштита – молекуларна дијагностика).

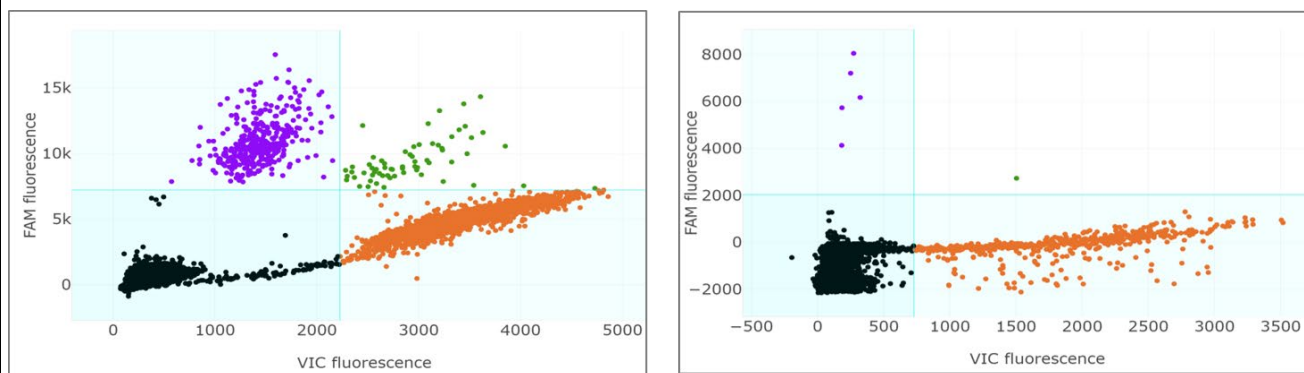
Во дополнение, покрај наведените 3 анализи, ЦБФА активно работи и на дизајн и валидација на други анализи со употреба на течна биопсија и dPCR, за детекција и квантификација на останати мутации за кои постои таргетирана терапија (пр. BRAF V600E за селекција на пациенти за терапија со BRAF инхибитори- енкофарениб, KRAS G12C за селекција на пациенти за терапија со KRAS инхибитор- соторасиб и сл.). Сите новововедени анализи би имале иста цена на чинење бидејќи користат иста апаратура и исти реагенси и потрошен материја за dPCR, изолација на вонклеточна ДНК од плазма и имаат еквивалентно времетраење на анализа и потреба од тим на здравствени работници. Спред тоа, сите дополнителни анализи воведени по истекот на извештајниот проект ќе можат да се наплаќаат под иста шифра (МОЛ436) од Ценовникот за здравствени услуги во специјалистичко консултативна здравствена заштита – молекуларна



дијагностика на Фондот за здравствено осигурување на Република Северна Македонија.



Слика 2. Детекција на различна алелна фреквенција (VAF) на EGFR p.Thr790Met мутацијата



Слика 3. Детекција на EGFR p.Thr790Met мутацијата кај ист пациент, во примерок од тумор земен со тенкоиглена биопсија, gDNA (лев панел) и примерок од плазма – течна биопсија ctDNA (десен панел)

Цел 3: употреба на набавената опрема во научно-истражувачки цели

Согласно Цел 3 (употреба на набавената опрема во научно-истражувачки цели) во



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ Скопје



времетраење на проектот беа започнати 2 научно-истражувачки проекти:

1. Проект за следење на одговор кон терапија кај пациенти со метастатски карцином на дебело црево позитивен за мутации во егзон 2 од KRAS генот. Овој проект се изведува во соработка со Универзитетската клиника за радиотерапија и онкологија, Скопје. За реализација на овој проект кај пациентите ќе биде направена иницијална корелација на алелната фреквенција на мутацијата (VAF) во примерок од ткиво (класична биопсија) и плазма (течна биопсија) пред започнување на терапијата. Во тек и по завршувањето на терапијата нивото на мутацијата (VAF) во плазма ќе биде следено со течна биопсија и dPCR, со цел корелација со клиничките параметри, мониторирање на одговорот, следење на минимална резидуална болест и прогноза на прогресијата на болеста. За потребите на овој проект беше воспоставена и валидирана аналитичка постапка за истовремена детекција на мутации во кодоните 12 и 13 во вториот егзон на генот KRAS (во една анализа). Со оваа анализа можат да се детектираат и квантифицираат следните мутации: c.35G>A p.G12D, c.35G>T p.G12V, c.34G>T p.G12C, c.35G>C p.G12A, c.34G>C p.G12R, c.38 G>A p.G13D, c.38G>T p.G13V и c.37G>C p.G13R. Валидацијата на постапката беше направена со користење на стандардите наменети за валидирање на методи со dPCR односно на слободна циркулирачка ДНК-течна биопсија Multiplex I cfDNA Reference Standard Set (HD780) и Quantitative Multiplex Reference Standard (HD701), Horizon Discovery, UK (Табела 2).
2. Проект за мониторирање на исходот од терапија со пегелиран интерферон алфа кај пациенти со миелопрлиферативни заболувања (полицитемија вера и есенцијална тромбоцитемија) во соработка со Универзитетската клиника за хематологија, Скопје. Успешноста на терапијата ќе биде корелирана со нивото на мутацијата V617F во генот JAK2 пред и по терапија со пегелиран интерферон алфа. За оваа намена беше воспоставена метода за детекција и квантификација на JAK2 V617F мутацијата со течна биопсија и dPCR. Во моментот се прави валидација на методата со користење на in-house стандарди – смеси со различен % на туморска ДНК со JAK2 V617F мутација со познат % на VAF (одредена со користење на NGS технологија) и нормална ДНК, приготвени во Центарот за биомолекуларни фармацевтски анализи.

По формалното завршување на проектот, достапноста на лабораториската инфраструктура за надворешни истражувачи, главно би се регулирала на сличен начин, односно преку пријавување на заеднички истражувачки проекти со други научно-истражувачки институции во кои активно би биле вклучени истражувачите на ЦБФА. Но, постои и можност за обезбедување на сервисни истражувачки услуги по ценовник со преференцијални цени на услуги (на принцип на покривање само на материјални трошоци) за научно истражувачки и развојни цели во рамки на јавните високо образовни и научно истражувачки установи. Целокупната лабораториска инфраструктура, вклучително и опремата набавена со овој проект ќе биде достапна и отворена и за цела научна и академска заедница и за други заинтересирани лица кои имаат потреба од користење на опремата за научно-истражувачки цели, по преференцијални цени за потребната услуга на принцип на покривање на материјални трошоци и техничко работење на наведената опрема (прилог Изјава за преференцијални цени на услуги за научно-истражувачки проект од посебен и јавен интерес (поддршка за развој на лабораториски ресурси) бр. XXXXXX).

Во дополнение, опрема која е набавена во рамки на овој проект се користеше и ќе се користи



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ Скопје



за едукативна дејност во рамките на наставата од прв циклус дипломиран лабораториски биоинжењер (предмет Молекуларни и имунолошки анализи), трет циклус докторски студии од областа Фармација (предмет Методи во молекуларна биологија и генетско инженерство) и за изведување на практична работа при изработка на специјалистички и докторски трудови во рамки на програмите од втор и трет циклус на студии на Фармацевтски факултет. Целокупната лабораториска опрема во ЦБФА, исто така ќе биде достапна и за едукација на млади истражувачи кои не се директно вклучени во наставните програми на Фармацевтски факултет, на пр. млади истражувачи со друга матична високо образовна или научно истражувачка установа и лица кои искажуваат интерес за стручно доусовршување/пракса кое е потребно за нивно професионално ангажирање во приватни и државни лаборатории каде се изведуваат генетски анализи. Во време на реализација на проектот, целокупната инфраструктура на ЦБФА активно беше користена од страна на младите истражувачи Елизабета Крстевска-Божиновиќ, Евгенија Михајлоска и Александар Димковски, студенти на трет циклус докторски студии на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје и Емилија Ѓоргиевска, студент на втор циклус магистерски студии по лабораториска анализа и инженерство во фармацијата на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје.

Дополнително, набавката на нова опрема доведе до проширување на опсегот на апликативната и научно-истражувачката работа во ЦБФА. Според тоа, се јави потреба од ангажирање на дополнителен персонал. Планирано е да се поднесе барање за трајно вработување на 1 техничко лице и 2 извршители на анализи согласно актот за систематизација на работни места на Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје. Во рамките на проектот беше ангажирано 1 лице, дипл. инж. биол. Ангела Јосковска, волонтер ангажирана за реализација на активностите предвидени во рамки на проектот, инаку студент на втор циклус магистерски студии по биологија- молекуларна биологија, на Природно Математички Факултет, УКИМ, Скопје.

Заклучно со ова, беа исполнети сите сегменти од третата зададена Цел (употреба на набавената опрема во научно-истражувачки цели) во рок соодветен на претпоставените временски рамки за реализација на целите и остварувањето на резултатите наведени во проектната апликација (Индикатори ИЗ.1: Започнување со мин. 1 научно-истражувачки проект, ИЗ.2: Прием на минимум 1 млад истражувач како волонтер или преку авторски договор, ИЗ.3: Изработка на ценовник со преференцијални цени на услуги (на принцип на покривање само на материјални трошоци) за научно истражувачки и развојни цели во рамки на јавните високо образовни и научно истражувачки установи).



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ Скопје



12. Финансиски извештај за трошоците кои се покриени со средствата одобрени од МОН за проект
(задолжително изразена во денари)

бр.	опис на трошок	исплатени (трошоци реализирани со досега исплатените средства од МОН)	неисплатени (обврски)
1	Набавка на dPCR систем, QuantStudio Absolute Q Digital PCR System, ThermoFisher Scientific (ф-ра бр. 22-390-000011)	6.059.300 (извор на финансирање МОН, 65%) + 3.262.700 (сопствено учество, 35%) = 9.322.000 вкупно	/
Вкупно		6.059.300 (извор на финансирање МОН, 65%) + 3.262.700 (сопствено учество, 35%) = 9.322.000 вкупно	/

Планирани средства 12.000.000 – реализирани средства 9.322.000
= преостанати средства 2.678.000 денари

ПРИЛОЗИ:

Кон извештајот како прилог доставуваме:

- Изјава за преференцијални цени на услуги за научно-истражувачки проект од посебен и јавен интерес (поддршка за развој на лабораториски ресурси) заверана со Архивски број на Фармацевтски факултет XXXXXX).
- Изјава за научно-истражувачки проект од посебен и јавен интерес (поддршка за развој на лабораториски ресурси) заверана со Архивски број на Фармацевтски факултет XXXXXX)
- Сертифика од оцена од надворешна контрола на квалитет на резултати (белодробен карцином, плазма)

ВЕРИФИКАЦИЈА НА ЗАВРШНИОТ ИЗВЕШТАЈ:

- Одлука на Наставно-научниот совет на Фармацевтски факултет за прифаќање на завршниот извештај (во прилог Одлука)

бр. _____

од _____ година

Главен истражувач	Декан
-------------------	-------



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ Скопје



Проф. д-р. Надица Матевска-Гешковска	Проф. д-р Зоран Стерјев
Датум: _____ Потпис и печат _____	