

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 11.03.2022. godine, broj 11/IV-3/3-JbJ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Ekspresija markera imunosupresije u epitelnim tumorima jajnika i njihova povezanost sa markerima autofagije“

kandidata dr Ljubiše Jovanovića, zaposlenog u Službi za patologiju i medicinsku citologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentor je doc. dr Radmila Janković.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Vesna Kesić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Svetislav Tatić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Slaviša Đuričić, profesor Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Ljubiše Jovanovića napisana je na ukupno 86 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 36 tabela i 10 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** su izneti podaci o učestalosti ovarijalnog karcinoma u populaciji, često kasnoj dijagnostici bolesti i nedostatku adekvatnih preventivnih metoda. Takođe se govori o

nedovoljnoj efikasnosti postojećih terapijskih protokola, visokom procentu recidiva i značajnoj stopi mortaliteta. Ističe se potreba za pronalaženjem efikasnijih terapijskih rešenja. Detaljno je opisana uloga antitumorskog, imunološkog odgovora sa posebnim osvrtom na značaj PD-1/PD-L1 signalnog puta i njegovog značaja kod ovarijalnih karcinoma. Na adekvatan način je opisan mehanizam autofagije i posebno njena uloga u nastanku tumora. Istaknuti su najbitniji proteini koji učestvuju u procesu autofagije, posebno p62, LC3 i Beclin1. Opisano je da PD-1/PD-L1 signalni put ima jednu od ključnih uloga u regulisanju intraćelijskih funkcija tumorskih ćelija i njihovog preživljavanja, a da je autofagija pod kontrolom PD-L1 receptora.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od analize ekspresije PD-L1 i markera autofagije (p62, LC3 i Beclin1) i njihove povezanosti sa različitim histološkim tipovima epitelnih tumora jajnika (serozni, mucinozni, endometrioidni). Takođe kao cilj rada navedeno je ispitivanje povezanosti ekspresije analiziranih imunohistohemijskih markera sa stepenom histološke diferencijacije tumora, ostalim patohistološkim parametrima (prisustvo limfovaskularne tumorske invazije, intratumorska i peritumorska limfocitna infiltracija, prisustvo nekroze) i sa FIGO stadijumima bolesti.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je sprovedena u Klinici za ginekologiju i akušerstvo, Univerzitetskog klinikog centra Srbije u Beogradu i u Institutu za patologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu. Detaljno su opisani način selekcije pacijentkinja, kriterijumi za isključenje iz studije i parametri koji se analiziraju. Opisana je metoda konstrukcije tkivnog mikroniza, kao i smernice za njegovu analizu. U radu je detaljno opisana imunohistohemijska analiza sa navođenjem karakteristika korišćenih klonova antitela i načinom tumačenja ekspresije svakog korišćenog antitela ponaosob. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je od strane Etičkog komiteta (1550/XI-40; 28.11.2019.) Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Etičkog komiteta Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (747/3; 19.07.2018). Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključanja u studiju.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati. Primenjene su adekvatne metode deskriptivne i analitičke statistike.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena literatura sadrži spisak od 178 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Istraživanje je obuhvatilo epitelne tumore jajnika različitog biološkog ponašanja, od čega su 122 pacijentkinje imale karcinome. Pokazano je da su pacijentkinje sa karcinomom bile najstarije i u menopauzi, u odnosu na pacijentkinje sa atipično proliferišućim tumorima i benignim tumorima jajnika koji su činili kontrolnu grupu. Serozni *high grade* histološki tip ovarijalnog karcinoma (HGSC) je najzastupljeniji i to u FIGO III stadijumu tumorske bolesti, sa značajno češćim prisustvom nekroze, limfovaskularne tumorske invazije i limfocitnog infiltrata. Maksimalni promer tumora nije pokazatelj veće agresivnosti tumora tj. nije u pozitivnoj korelaciji sa agresivnim ponašanjem tumora. Maligni tumori jajnika su značajno češće bilateralni. Pokazana je značajno veća ekspresija PD-L1 receptora u ovarijalnim karcinomima u odnosu na APT i benigne tumore jajnika. Serozni histološki tip ovarijalnih karcinoma u ovom istraživanju pokazuje značajno izraženiju PD-L1 ekspresiju u odnosu na mucinozne i na endometriodine karcinome. U grupi seroznih karcinoma izdvaja se HGSC podtip sa upadljivo višom PD-L1 ekspresijom, ukazujući na značajnu aktivaciju PD-1/PD-L1 regulatornog mehanizma u tom tipu tumora. HGSC histološki tip ovarijalnih karcinoma pokazuje značajno viši nivo PD-L1 ekspresije u invazivnim delovima karcinoma. Prilikom poređenja PD-L1 ekspresije u različitim delovima karcinoma i korelacije sa tipom limfocitnog infiltrata, pokazana je značajna udruženost PD-L1 ekspresije centralnih delova HGSC sa intratumorskim limfocitnim infiltratom. Odbačena je pretpostavka da bi invazivni delovi karcinoma mogli biti udruženi sa statistički značajnim prisustvom peritumorskog limfocitnog infiltrata.

Dokazano je da kategorije ekspresije p62, LC3 i Beclin1 markera koreliraju sa stepenom agresivnosti epitelnih ovarijalnih tumora. Pokazana je značajno viša ekspresija sva tri analizirana markera u ovarijalnim karcinomima, u odnosu na APT i posebno benigne tumore. Udružena analiza p62, LC3 i Beclin1 markera autofagije omogućava bolji uvid u dinamiku procesa autofagije kod različitih tumora jajnika. Upporedno tumačenje ekspresije ovih markera doprinosi njihovom većem prognostičkom potencijalu. Pokazana je značajna udruženost sva tri analizirana markera sa analiziranim parametrima, pri čemu ekspresije p62 i LC3 markera pokazuju homogeniju distribuciju u odnosu na Beclin1 ekspresiju koja je više heterogena. U

odnosu na histološki tip ovarijalnih karcinoma uočena je značajna zastupljenost p62 i LC3 ekspresije u seroznim karcinomima, posebno HGSC tipa.

U ovom istraživanju analizirano je poređenje stepena ekspresije imunosupresivnog PD-L1 receptora i p62, LC3 i Beclin1 autofagnih molekula. Poređenje je vršeno i u centralnim i u invazivnim delovima ovarijalnih karcinoma gde su pokazane statistički značajne razlike između stepena ekspresija PD-L1 markera i ekspresija p62 i LC3 markera. Distribucija uporedne ekspresije PD-L1 markera sa markerima autofagije p62, LC3 i Beclin1 vršena je u odnosu na sve analizirane demografske, kliničke i patohistološke parametre pri čemu nije uočena statistički značajna razlika u ekspresijama svih analiziranih markera. Nisu uočene statistički značajne razlike među analiziranim markerima kod svih ispitivanih histoloških tipova. Analizirane statističke značajnosti ukazuju na jednaku udruženu potencijalnu prognostičku vrednost ispitivanih markera kod svih histoloških tipova.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

PD-L1 receptor je jedan od molekula čija se funkcija aktuelno istražuje, posebno u odnosu na druge molekule i regulatorne faktore u tumorskom mikrokruženju (Scognamiglio et al., 2016; Teng et al., 2015; Santoiemma et al., 2015). U našem istraživanju pokazali smo značajno veću ekspresiju PD-L1 receptora u ovarijalnim karcinomima u odnosu na APT i benigne tumore jajnika. Imunohistohemijskom analizom PD-L1 ekspresije u tumorskom tkivu može se odrediti indikacija za primenu ciljane imunološke terapije koja bi trebalo da poboljša ishode lečenja pacijenata (Darb-Esfahani et al., 2016; Scognamiglio et al., 2016; Santoiemma et al., 2015). Visoka PD-L1 ekspresija (umerena i jaka) se smatra indikacijom za primenu imunološke terapije. Aktuelna su istraživanja koja pokušavaju standardizaciju interpretacije rezultata PD-L1 ekspresije.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da HGSC histološki tip ovarijalnog karcinoma pokazuje značajno višu PD-L1 ekspresiju u odnosu na druge histološke tipove. Druge studije takođe pokazuju da su PD-1 i PD-L1 molekuli bitni regulatorni imunološki proteini sa značajnom prognostičkom ulogom kod HGSC tipa (Darb-Esfahani et al., 2016). Pojedini autori opisuju značajnu razliku u PD-L1 ekspresiji između nisko gradusnih (*low grade* serozni karcinom-LGSC) i visoko gradusnih (HGSC) ovarijalnih karcinoma. Takođe je dokazana udruženost PD-L1 ekspresije na tumorskim ćelijama i povoljne prognoze bolesti pacijentkinja sa HGSC histološkim tipom ovarijalnog karcinoma (Darb-Esfahani et al., 2016; Nhokaew et al., 2019; Chen et al., 2020). Slično rezultatima ovog istraživanja, dokazana je udruženost visoke PD-L1

ekspresije sa histološkim parametrima koji ukazuju na veću agresivnost karcinoma (nekroza, limfovaskularna tumorska invazija, limfocitni infiltrat). Ističe se pozitivna korelacija PD-L1 ekspresije sa višim FIGO stadijumom i gradusom tumora kao nezavisnim prognostičkim parametrima. Ekspresija PD-L1 markera na ćelijama ovarijalnog karcinoma je nezavistan nepovoljan prognostički faktor. To ukazuje na značajnu ulogu PD-L1 markera u odnosu na klinički tok bolesti, čija prekomerna ekspresija sugerira veći metastatski potencijal tumorskih ćelija (Abiko et al., 2013).

U ovoj studiji pokazana je statistički značajno izraženija PD-L1 ekspresija u invazivnim delovima ovarijalnog karcinoma. Vršeno je poređenje PD-L1 ekspresije u različitim delovima karcinoma sa tipom i zastupljenošću limfocitnog infiltrata pri čemu je pokazana značajna udruženost PD-L1 ekspresije centralnih delova HGSC sa intratumorskim limfocitnim infiltratom. Pojedine studije su pokazale prediktivne razlike između peritumorskog i intratumorskog limfocitnog infiltrata u odnosu na PD-L1 ekspresiju u HGSC tipu tumora. Uočena je pozitivna korelacija između intratumorskog limfocitnog infiltrata i dužeg preživljavanja pacijentkinja obolelih od HGSC ovarijalnog karcinoma (Darb-Esfahani et al., 2016). Intratumorski limfocitni infiltrat je opisan kao najznačajniji prognostički faktor koji određuje biološko ponašanje ovarijalnih karcinoma (Santoiemma et al., 2015).

Ova studija pokazuje značajno veće stepene ekspresije p62, LC3 i Beclin1 markera u grupi ovarijalnih karcinoma u odnosu na APT i posebno benigne tumore, što je slično rezultatima drugih studija (Cai et al., 2014; Ju et al., 2016). Istraživanja pokazuju da se udruženom primenom i korelacijom dva ili više markera procesa autofagije dobijaju validniji rezultati u odnosu na analizu pojedinačnih markera (Bortnik et al., 2017; Iwadate et al., 2014; Hu et al., 2016). Analizom različitih tipova karcinoma pokazana je udruženost značajne ekspresije LC3 markera i veće agresivnosti tumora, što je u skladu sa našim podacima (Klionsky et al., 2016; Bortnik et al., 2017; Lazova et al., 2012). Heterogena ekspresija Beclin1 markera u našim ovarijalnim karcinomima se može objasniti dodatnim funkcijama koje Beclin1 molekul ispoljava a nisu direktno povezane sa procesom autofagije (Minamoto et al., 2018). Skorašnje studije pokazuju da je visoka ekspresija Beclin1 markera povezana sa boljim ishodom ovarijalnih karcinoma (Chen et al., 2020). Tumačenje ovakvih rezultata se može zasnovati na tumor supresivnoj funkciji Beclin1 gena koja stimuliše antitumorske procese kao što su inhibicija ćelijskog ciklusa, inhibicija ćelijske proliferacije, promocija autofagije i apoptoze (Cai et al., 2014; Chen et al., 2020). U skladu sa tim opisana je povezanost odsustva Beclin1 ekspresije kao nezavisnog pokazatelja loše prognoze bolesti pacijentkinja obolelih od

ovarijalnog karcinoma (Minamoto et al., 2018). Studije opisuju mnogo češću učestalost Beclin1 ekspresije kod nisko gradusnih ovarijskih karcinoma u odnosu na visoko gradusne karcinome (Valente et al., 2014). Takav obrazac ekspresije ukazuje da je nizak nivo procesa autofagije udružen sa progresijom ovarijskog karcinoma, dok je ushodna regulacija autofagije povezana sa manje agresivnim histološkim tipovima ovarijskog karcinoma (Valente et al., 2014; Cao et al., 2007). Značajno veći broj istraživanja je pokazao pozitivnu korelaciju visoke ekspresije Beclin1 markera sa većom agresivnošću tumora kod različitih karcinoma. Smatra se da je promocija procesa autofagije praćena nivoom ekspresije Beclin1 markera pokazatelj aktivacije autofagnog procesa tumorskih ćelija kojom one pribegavaju u cilju preživljavanja, uglavnom kod agresivnijih tumorskih tipova (Bortnik et al., 2017; Zhao et al., 2014). Naše istraživanje pokazuje da su ekspresije p62 i LC3 markera statistički značajno udružene sa višim gradusom i FIGO stadijumima tumora. Beclin1 ekspresija je u odnosu na p62 i LC3 markere izraženije povezana sa nižim tumorskim gradusima i FIGO stadijuma, što je slično dosadašnjim istraživanjima (Lin et al., 2013; Minamoto et al., 2018; Zhao et al., 2014). Opisuje se udruženost Beclin1 ekspresije i diferencijacije tumora, ističući Beclin1 marker kao protektivni faktor ovarijskih karcinoma (Cai et al., 2014).

Međusobno poređenje ekspresija imunosupresivnih i autofagnih markera nije dovoljno zastupljeno u dosadašnjoj literaturi. Do sada je takvo poređenje analizirano samo na ćelijskim kulturama (Clark et al., 2016). Uporedna imunohistohemijska analiza ovih markera na tkivnim uzorcima ovarijskih karcinoma nije do sada rađena. Clark i saradnici su među prvima istraživali povezanost mehanizma autofagije i PD-1/PD-L1 imunološkog signalnog puta ukazujući da PD-L1 ekspresija na tumorskim ćelijama može uticati na terapijske efekte inhibitora autofagije u pojedinim tipovima karcinoma (Clark et al., 2017; Brogden et al., 2016). Istraživanja takođe pokazuju da inhibicija PD-1/PD-L1 mehanizma stimuliše proces autofagije u tumorskim ćelijama. Blokiranjem vezivanja PD-L1 liganda za svoj receptor PD-1, u tumorskim ćelijama se aktiviraju katabolički procesi koji obezbeđuju hranljive materije tumorskoj ćeliji i omogućavaju njeno preživljavanje. S obzirom da se inhibiranjem PD-1/PD-L1 signalnog puta stimulišu procesi autofagije, smatra se da tumorske ćelije postaju senzitivnije na efekte inhibitora autofagije. Pretpostavka je da bi udružena primena inhibitora autofagije kod pacijenata sa izraženom ekspresijom PD-L1 markera na tumorskim ćelijama dovela do boljih terapijskih odgovora u lečenju ovarijskog karcinoma (Robainas et al., 2017; Clark et al., 2016).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Ljubisa Jovanovic, Radmila Jankovic, Andja Cirković, Milena Jovic, Tijana Janjic, Slavisa Djuricic, Svetlana Milenkovic. **PD-L1 Expression in Different Segments and Histological Types of Ovarian Cancer According to Lymphocytic Infiltrate.** Medicina (2021) 57:1309.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Ekspresija markera imunosupresije u epitelnim tumorima jajnika i njihova povezanost sa markerima autofagije“ dr Ljubiša Jovanović, predstavlja originalni naučni doprinos u boljem razumevanju antitumorskih signalnih mehanizama kod ovarijalnih karcinoma. Primenom imunohistohemijske analize stepena ekspresije markera imunosupresije PD-L1 i markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 definisani su značajni prognostički markeri koji bi mogli odrediti efikasnije terapijske postupke u lečenju ovarijalnog karcinoma. Pacijentkinje sa udruženom visokom ekspresijom antitela PD-L1 i markera autofagije mogle bi biti kandidati za sinergističku terapijsku primenu inhibitora PD-L1 receptora i inhibitora autofagije. Slaba ekspresija ovih markera sugerise lošiji terapijski odgovor i veći rizik za relaps bolesti. Analizom stepena ekspresije markera imunosupresije i autofagije ukazani su „cut off-ovi“ koji bi mogli imati značajnu ulogu u odabiru pacijentkinja za primenu ciljane terapije. Upotreba ovih markera u kliničkoj praksi mogla bi dovesti do boljih terapijskih ishoda u lečenju pre svega agresivnijih tipova karcinoma jajnika.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Ljubiše Jovanovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 22.03.2022.

Članovi Komisije:

Prof. dr Vesna Kesić

Prof. dr Svetislav Tatić

Prof. dr Slaviša Đuričić

Mentor:

Doc. dr Radmila Janković
