

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU**

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 12.07.2024. godine, broj 19/XXVIII-3/3-БГ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Ekspresija i prognostički značaj liganda programirane ćelijske smrti 1 (PD-L1) kod karcinoma jajnika“

kandidata dr Bojane Gutić, zaposlene u Institutu za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici. Mentori su prof. Dr Tatjana Božanović, prof. Dr Lazar Popović, prof. Dr Tatjana Ivković Kapicl.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. prof. Dr Svetislav Tatić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. prof. Dr Snežana Vidaković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. prof. Dr Miroslava Gojnić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. prof. Dr Aljoša Mandić, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu
5. doc. Dr Milan Dokić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

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 Bojane Gutić napisana je na ukupno 70 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 13 tabela, dva grafikona i 20 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji.

U **uvodu** su prezentovane osnovne epidemiološke i kliničko-patološke karakteristike karcinoma ovarijuma. Prikazana su i aktuelna saznanja o njegovoj etiopatogenezi. Prezentovan je način klasifikacije i osnovne smernice za trenutne mogućnosti dijagnostike i lečenja karcinoma ovarijuma.

U drugoj celini uvoda prezentovane su osnove imunog sistema i njegova uloga u onkogenezi karcinoma ovarijuma. U pogledu uloge u onkogenezi opisan je mehanizam negativne regulacije na nivou sinapse receptora programirane ćelijske smrti 1 i njegovog liganda (PD-1 i PD-L1). Takođe, opisani su i potencijalni mehanizmi regulacije ove sinapse i njenog efekta.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja ekspresija PD-L1 u različitim stadijumima i histološkim tipovima karcinoma ovarijuma. Takođe kao cilj rada navedena je i prediktivna uloga PD-L1 ekspresije u odnosu na standardnu terapiju i prognostički značaj u odnosu na tok bolesti.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o kohortnoj studiji, koja je sprovedena u Institutu za onkologiju Vojvodine. Detaljno je opisan način i vrsta retrospektivno prikupljenih podataka. Jasno su definisani podaci o vrsti i ishodu lečenja u vidu vrste hirurške resekcije i odgovora na hemioterapiju. Takođe, navedeni su postupci za evaluaciju toka bolesti, kao i vremenski period praćenja. Prospektivni deo istraživanja je detaljno opisan. Naveden je način uzorkovanja i bojenja preparata, kao i vrsta korišćenih antitela. Dalje, opisan je način interpretacije dobijenih rezultata i sprovedena poređenja sa prikupljenim kliničko-patološkim parametrima.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

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 90 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza iz programa *iThenticate* konstatovano je podudaranje 10% teksta, kao posledica citata i korišćenih opštih podataka, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika. Na osnovu iznetog, a u skladu sa članom 8. Stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije. („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

C) Kratak opis postignutih rezultata

U rezultatima je prikazana ekspresija PD-L1 na tumor infiltrirajućim limfocitima (TIL), tumor asociranim makrofagima (TAM) i tumorskim ćelijama (TC;TPS). Najizraženija ekspresija je zabeležena na tumor infiltrirajućim limfocitima, kod 53% ispitanica, dok je niža ekspresija zabeležena na tumor asociranim makrofagima (40%) i na tumorskim ćelijama (21%). Ekspresija je ređe prisutna na jednoj ili dve vrste ćelija (oko 30%), nego na sve tri ispitivane vrste (10,5%). Analizom scoring sistema, najčešće dobijena vrednost je bila > 1 (20,2%), a najređa > 10 (4,4%).

U odnosu na kliničko-patološke karakteristike izneto je da postoji razlika između nižih i viših stadijuma bolesti, kao i histološkog tipa karcinoma ali intenzitet povezanosti nije dovoljno snažno izražen da bi bio statistički značajan. Zabeležena je niža ekspresija u početnim stadijumima bolesti, kao i karcinomima tip 1 u odnosu na tip 2. Kada je u pitanju gradus tumora, prikazana je statistički marginalno značajna veza na tumor infiltrirajućim limfocitima. Visok gradus češće je bio praćen prisustvom ekspresije PD-L1 u tumor infiltrirajućim limfocitima, dok je nizak gradus bio praćen odsustvom ekspresije PD-L1 ($\chi^2 (1) = 3,76, p = ,052$). Kada je korišćen CPS postojala je statistički značajna povezanost CPS > 1 i visokog gradusa ($\chi^2 (1) = 7,071, p = ,008$). Izvesne razlike zabeležene su i kada je ispitivan odnos ekspresije PD-L1 i limfovaskularne invazije, te je postojala povezanost samo kada je su rezultati interpretirani u vidu CPS i povezanost je bila statistički marginalno značajna ($\chi^2 (1) = 2,045, p = ,085$).

PD-L1 kao prediktivni faktor se pokazao značajnim kada je ekspresiran na tumorskim ćelijama u odnosu na odgovor na standardnu terapiju ($\chi^2 (2) = 7,50, p = ,024$). Kod kompletnog odgovora na terapiju je češće bila prisutna ekspresija PD-L1, kod parcijalnog odgovora na terapiju je ekspresija ili odsustvo ekspresije jednako učestalo, dok je kod progresije bolesti češće zabeleženo odsustvo ekspresije PD-L1.

Prognostička uloga PD-L1 ispitana je analizom povezanosti ekspresije PD-L1 i vremena do progresije bolesti. Iako rezultati ukazuju na odsustvo značajnih razlika između ekspresije PD-L1 u tumor infiltrirajućim limfocitima ($r = -0,194, p = ,243$), tumor infiltrirajućim makrofagima ($r = -0,114, p = ,496$) i u tumorskim ćelijama ($r = -0,234, p = ,158$) sa PFS-om, primetna je očekivana i dosledno dobijene negativna korelacija između ove dve varijable.

Analizom preživljavanja dobijene su marginalno značajne razlike u preživljavanja pacijentkinja sa karcinomom ovarijuma u odnosu na ekspresiju PD-L1 na tumorskim ćelijama (LRT (1) = 1,36, p < ,05).

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Podaci iz literature su u značajnoj meri heterogeni. Razlog ovome je mali broj ispitanica, što je i najčešći nedostatak studija koje su obrađivale ova pitanja. U ispitivanom uzorku najzastupljenija ekspresija PD-L1 je bila na TIL (53%), dok je u tumorskim ćelijama ekspresija bila prisutna samo kod 21%. U literaturi se može naći širok raspon ekspresije PD-L1 kod karcinoma jajnika. Slično prikazanim rezultatima u studiji Eymerit-Morin i sar. prikazane su relativno niske vrednosti ekspresije PD-L1 na tumorskim ćelijama (14-28%) uz značajnu heterogenost u ekspresiji zavisno od korišćenih antitela i načina interpretacije (Eymerit-Morin i sar., 2021). Wang i sar. su detektovali ekspresiju PD-L1 na ćelijskoj membrani, kao i u prezentovanoj disertaciji. Međutim bojenje je vršeno upotrebom monoklonskog antitela za PD-L1, klon E1L3N. U ispitivanom uzorku pozitivna ekspresija PD-L1 na tumorskim ćelijama je detektovana, približno izloženim rezultatima, kod 24,30% pacijentkinja, ali je ekspresija na TIL bila značajno niža 15,89% (Wang i sar., 2017). Opravdano, korišćeno antitelo (E1L3N) i interpretacija rezultata su opisani kao potencijalni uzrok ovim rezultatima. Tako je i u studiji Eymerit-Morin i sar. uočena je razlika (oko 14%) između rezultata dobijenih upotrebom različitih antitela (E1L3N i QR1) (Eymerit-Morin i sar., 2021). Upotrebom E1L3N detektovana je veća senzitivnost u vidu češće detektovanih ekspresija preko 10% ali su se QR1 klon i CPS u odnosu na TPS pokazali kao bolji izbor za evaluaciju PD-L1 statusa kod pacijentkinja obolelih od karcinoma ovarijuma (Eymerit-Morin i sar., 2021). U literaturi su prisutne i studije sa značajno višim vrednostima. U jednoj od ovakvih studija je prezentovana ekspresije PD-L1 od 44,16% (Xue i sar., 2019). U diskusiji teze su navedene razlike u metodologiji koje jasno oslikavaju potencijalni uzrok za neslaganje sa dobijenim rezultatima, kao što su detekcija na membrani tumorskih ćelija ali i u citopolazmi, deksriptivni način interpretacije. Navedeno bi trebalo smatrati kao prednost prezentovane teze, s obzirom na to da su jasno definisani značaj mesta ekspresije, kao i preciznija interpretacija rezultata.

Kada je analizirana detekcija na različitim ćelijama, takođe je prisutno značajno neslaganje u aktuelnim literaturnim podacima. Slično rezultatima u doktorskoj disertaciji, u jednoj od studija pokazano je takođe najviša ekspresija na limfocitima (Martin de la Fuente i sar., 2020; Wang i sar., 2017).

Izneti rezultati ukazuju na značaj posmatranja mikrokruženja tumora pre nego izolovano posmatranje pojedinačnih faktora. Prednost disertacije jeste što su uključene isključivo pacijentkinje koje nisu prethodno lečene.

Disertacija nam ukazuje na zahteve i poteškoće u pogledu detekcije i interpretacije ekspresije koji u velikoj meri mogu uticati na ishode. U dosadašnjim istraživanjima, kao bitne karakteristike izdvajaju se nestandardizovani postupci kako u detekciji, tako i u interpretaciji ekspresije PD-L1 kod karcinoma jajnika. Za razliku od drugih maligniteta, kada se govori o karcinomu ovarijuma, još uvek ne postoji standardizovan pristup ni jasno definisan značaj ekspresije PD-L1.

Na to da je imuni odgovor i mikrokruženje karcinoma ovarijuma dinamička sredina ukazuju studije u kojima je prezentovana razlika u ekspresiji kako u odnosu na mesto uzorkovanja unutar tumora, tako i vrstu promene (primarna ili metastatska promena, kao i primarni tumor ili recidiv bolesti) (Aust i sar., 2017). Ovo je još jedan od razloga za heterogenost podataka u literaturi ali i značajna smernica za buduća istraživanja.

Značaj ekspresije PD-L1 kod obolelih od karcinoma ovarijuma ispitana je analizom povezanosti sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanica. Iako bez statističke značajnosti u ispitivanom uzorku češće je prisutna ekspresija u uznapredovalim u odnosu na početne stadijume bolesti. Ovo je u skladu sa podacima u literaturi, koji su pokazali pozitivnu povezanost PD-L1 ekspresije i Figo stadijuma bolesti ($p=0,026$; $p=0,023$) (Xue i sar., 2019; Wang i sar., 2017). U studijama koje su iznele suprotne vrednosti, korišćena su različita antitela (Darkes i sar., 2018). Kada je u pitanju histološki tip tumora, iako češće prisuta na imunim ćelijama u tipu 2, navedene razlika je bila nesignifikantna. U literaturi se najčešće beleži razlika u ekspresiji u koist *high grade* seroznog karcinoma (58% u odnosu na 38%, $p < 0,05$) (Cheng i sar., 2018). Značajna veza sa drugim kliničko patološkim karakteristikama, kao i u literaturi, nije zabeležena (Xue i sar., 2019).

U literaturi je prognostički značaj ekspresije PD-L1 analiziran je u studijama različitog dizajna. Analizom preživljavanja na ispitivanom uzorku prezentovana je samo marginalno značajno duže preživljavanje u grupi pacijentkinja koje su imale eksprimiran PD-L1 na tumorskim ćelijama i to nakon dve godine praćenja. Ovo je u skladu sa studijom Darkes i sar., gde, iako startno nije postojala razlika, prognostički PD-L1 pozitivna podgrupa je pokazala bolje preživljavanje sa dužim protokom vremena od postavljanja dijagnoze (Darkes i sar., 2018). Takođe, jedna od studija pokazala je benefit u preživlja-

vanju ($p=0,02$) u grupi visoke ekspresije PD-L1 na makrofagima, što je u skladu sa iznetim rezultatima (Martin de la Fuente 2020).

Prema dosadašnjim istraživanjima još uvek nije identifikovan prediktivni i prognostički značaj ekspresije PD-L1 kod karcinoma ovarijuma. Razlog ovome možemo tražiti upravo u spomenutom, malom uzorku većine studija. Ovome doprinosi i relativno niska ekspresija ali i nepotpuno poznavanje strukturnih i funkcionalnih karakteristika signalnog puta, u kom učestvuje PD-L1, kao i njegovog odnosa sa faktorima iz mikrokruženja.

Na iznetim podacima se vide ograničenja ovog istraživanja veličinom uzorka, te nedovoljnom snagom statističkih testova da se dokaže povezanost. Sa druge strane izneti rezultati pružaju uvide i smernice za dalja istraživanja. Takođe, u medicinskim istraživanjima, razlika između statističke i kliničke značajnosti se ne sme zanemariti. Statistička značajnost odnosi se na verovatnoću da su rezultati dobijeni slučajno, dok klinička značajnost razmatra praktičnu važnost i primenljivost rezultata. Iako statistička značajnost ostaje ključni element kvantitativnih istraživanja, klinička relevantnost i primenljivost rezultata su od suštinske važnosti.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Gutic B, Bozanovic T, Mandic A, Dugalic S, Todorovic J, Stanisavljevic D, Dugalic MG, Sengul D, Detanac DA, Sengul I, Detanac D, Soares JM Junior. Programmed cell death-1 and its ligands: Current knowledge and possibilities in immunotherapy. *Clinics (Sao Paulo)*. 2023 Mar 14;78:100177. doi: 10.1016/j.clinsp.2023.100177. PMID: 36931099; PMCID: PMC10025950.

M22 IF: 2,7

Gutic B, Bozanovic T, Mandic A, Dugalic S, Todorovic J, Dugalic MG, Sengul D, Detanac DA, Sengul I, Detanac D, Kesicioglu T, Soares Junior JM. Preliminary outcomes of five-year survival for ovarian malignancies in profiled Serbian Oncology Centre. *Clinics (Sao Paulo)*. 2023 May 4;78:100204. doi: 10.1016/j.clinsp.2023.100204. PMID: 37148829; PMCID: PMC10757273.

M22 IF: 2,7

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Ekspresija i prognostički značaj liganda programirane ćelijske smrti 1 (PD-L1) kod karcinoma jajnika“ dr Bojane Gutić, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju pre svega imunoloških zbivanja kod karcinoma ovarijuma.

Njihov sled i međusobni odnos faktora tumorskog mikrookruženja. Oblast istraživanja je iz domena aktuelnih studija koje ispituju karcinom ovarijuma ali i onkologije u širem smislu. Odgovori na pitanje etiopatogeneza kao značajnog faktora za razumevanje nastanka karcinoma ovarijuma u budućnosti bi mogli doprineti preciznijem, individualizovanom lečenju ovih pacijentkinja, a time i dužem preživljavanju. Iako suočeni sa teškoćama malog broja ispitanika ovakvih studija, nesumnjivo je značajno postojanje istih kao dela sveobuhvatnih analiza i budućih zaključaka.

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

U Beogradu, 15.07.2024.

Članovi Komisije:

Prof. dr Svetislav Tatić

Prof. dr Snežana Vidaković

Prof. Dr Miroslava Gojnić Dugalić

Prof. Dr Aljoša Mandić

doc. Dr Milan Dokić

Mentori:

prof. Dr Tatjana Božanović

prof. Dr Lazar Popović

prof. Dr Tatjana Ivković Kapicl
