

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Ljubiša Z. Jovanović

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

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Ljubiša Z. Jovanović

Expression of immunosuppression markers in
epithelial ovarian tumors and their association
with autophagy markers

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

Mentor: Doc. dr Radmila Janković, docent, Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. Prof. dr Vesna Kesić, redovni profesor, Klinika za ginekologiju i akušerstvo, Univerzitetski Klinički Centar Srbije
2. Prof. dr Svetislav Tatić, redovni profesor, Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Slaviša Đuričić, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

Datum odbrane:

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

Sažetak

Uvod: Epitelni tumori jajnika čine oko 90% svih ovarijalnih tumora. Poreklo vode od ćelija mezotela koje oblažu površinu jajnika tj. od epitelnih *Mullerian type* ćelija jajovoda. U odnosu na sposobnost proliferacije epitela, dele se na benigne, maligne i atipično proliferišuće tumore (ATP) jajnika. Ovarijalni karcinomi spadaju u grupu malignih ginekoloških tumora sa najvećom stopom mortaliteta širom sveta. Uprkos primenjenoj terapiji, pacijentkinje sa uznapredovalim stadijumima bolesti vrlo slabo reaguju na do sada primenjene modalitete lečenja. Ovarijalni karcinomi vrlo efikasno suprimiraju imunološke odgovore domaćina. U karcinomskim ćelijama PD-L1 regulatorni mehanizam može zaštititi tumor od citotoksičnih T-limfocita narušavajući antitumorski imunitet. Autofagija je vrlo bitna u nastanku i razvoju neoplastičnih procesa, kao i u reagovanju tumora na razne oblike antitumorske terapije. Primećeno je da inhibicija PD-1/PD-L1 mehanizma stimuliše proces autofagije u tumorskim ćelijama i omogućava njihovo preživljavanje.

Ciljevi: Analiza imunohistohemijske ekspresije PD-L1 molekula i markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u epitelnim tumorima jajnika, u odnosu na histološki tip tumora, stadijum tumora, kao i njihovu regionalnu distribuciju unutar tumorskog tkiva (centralna u odnosu na periferna područja najinvazivnijeg rasta tumorskog tkiva) i u odnosu na postojanje ili nedostatak reaktivne limfocitne infiltracije. Analiza potencijalne međusobne povezanosti karakteristika ekspresije pomenutih markera i njihove povezanosti sa najvažnijim kliničkim i patohistološkim parametrima bolesti.

Materijali i metode: U studiju je uključeno 328 pacijentkinja operisanih zbog epitelnih tumora jajnika u periodu od 2017.-2019. godine, u Klinici za ginekologiju i akušerstvo Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu. Ovarijalni karcinom (OK) imale su 122 pacijentkinje, APT tumore 42 pacijentkinje, dok su kontrolnu grupu činile 164 pacijentkinje sa epitelnim benignim ovarijalnim tumorima (BOT). Nakon standardne histološke obrade iz ukalupljenog tumorskog tkiva uzorkovani su vitalni delovi tumora koji su upotrebom 3mm punkcione igle premeštani u recipijentne parafinske kalupe na taj način formirajući tkivne mikronizove. Iz ovarijalnih karcinoma su pored centralnih dodatno uzorkovani periferni delovi tumora sa najizraženijom limfocitnom reakcijom. Imunohistohemijska analiza antitelima PD-L1, p62, LC3 i Beclin1 rađena je u Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Imunohistohemijsko bojenje analizirano je utvrđivanjem broja pozitivno obeleženih tumorskih ćelija procentualno određenih u odnosu na ukupan broj tumorskih ćelija na vidnom polju uveličanja x400. Kao pozitivna ćelijska reakcija smatra se bilo koje delimično ili kompletno membransko PD-L1 bojenje najmanje jedne vitalne tumorske ćelije tj. citoplazmatsko bojenje p62, LC3 i Beclin1 antitelima. Definisana su četiri stepena imunoekspresije s obzirom na procenat imunopozitivnih tumorskih ćelija od ukupnog broja tumorskih ćelija i to: negativna (0) bez pozitivnih ćelija ili sa pojedinačnim pozitivnim ćelijama (<1%); slaba (1+) ekspresija sa manje od 10% pozitivnih ćelija; umerena (2+) ekspresija sa 10-50% pozitivnih ćelija i jaka (3+) ekspresija sa više od 50% ekspresije. Kao tumori sa visokim stepenom ekspresije smatrani su tumori sa umerenom i jakom imunopozitivnošću. Statistička analiza obuhvata deskriptivne i analitičke metode korišćenjem odgovarajućih statističkih testova koji su tumačeni na nivou značajnosti nulte hipoteze od $p < 0,05$. Statistička analiza je rađena korišćenjem softverskog paketa Statistical Package for Social Sciences 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Rezultati: Ekspresija PD-L1 markera je izraženija u OK u odnosu na APT i BOT. Visok stepen PD-L1 imunoekspresije je registrovan najčešće u seroznim OK (79,6%), statistički

značajno češće ($p < 0,001$) nego u mucinoznim (30,0%) i endometrioidnim (33,3%) karcinomima jajnika. Visoka ekspresija PD-L1 je bila značajno češća ($p = 0,007$) u seroznim karcinomima visokog gradusa, *high grade* serozni karcinomi- HGSC (83,5%), nego u seroznim karcinomima niskog gradusa, *low grade* serozni karcinomi- LGSC (50,0%). U svim tipovima analiziranih karcinoma jajnika, tumori u višem stadijumu (stadijum III i IV prema klasifikaciji Internacionalnog udruženja ginekologa i akušera- FIGO), češće su pokazivali visoku ekspresiju PD-L1 u odnosu na tumore nižeg stadijuma (stadijumi I i II)- (95,2% : 23,1%). U područjima tumorske invazije PD-L1 imunoekspresija je bila u svim tipovima karcinoma jajnika statistički značajno naglašenija nego u centralnim područjima tih tumora ($p < 0,001$). Kada se ove razlike analiziraju u odnosu na histološki gradus i tip karcinoma, dobijamo rezultate po kojima je stepen visoke imunoekspresije PD-L1 značajno viši u invazivnim područjima (96,7%) nego u centralnim područjima HGSC (83,5%; $p < 0,001$), dok statistička značajnost tih razlika izostaje pri poređenju perifernih i centralnih područja LGSC, mucinoznih i endometrioidnih karcinoma. Značajno veća učestalost visokog stepena PD-L1 imunoekspresije zabeležen je u centralnim područjima HGSC karcinoma jajnika u kojima je postojala intratumorska reaktivna limfocitna infiltracija (84,3%) u odnosu na centralna područja tumora bez te infiltracije (50,0%; $p = 0,003$). Imunoekspresija p62, LC3 i Beclin1 je bila izrazito višeg stepena u OK u odnosu na APT i BOT ($p < 0,001$). Ekspresije markera p62, LC3 i Beclin1 pokazuju statistički značajnu pozitivnu korelaciju između centralnih i invazivnih delova ovarijalnih karcinoma ($p < 0,001$). Ta korelacija je izrazito pozitivna kada se analiziraju markeri p62 i LC3. Stepen imunoekspresije markera autofagije p62 i LC3 se nalazi u pozitivnoj korelaciji sa HGSC histološkim tipom, stadijumom tumorske bolesti i histološkim gradusom tumora. Beclin1 ekspresija je zastupljenija u preostalim histološkim tipovima ovarijalnog karcinoma. Korelacija Beclin1 ekspresije sa stadijumom i gradusom tumora je bila negativna. Stepen ekspresije PD-L1 nije se statistički značajno razlikovao od stepena ekspresije markera autofagije ni u jednom od histoloških tipova karcinoma jajnika. Međutim, stepen imunoekspresije u odnosu na centralne i periferne, invazivne delove tumora, značajno se razlikovao između PD-L1 i markera autofagije p62 i LC3. Ta razlika ponovo je izostala pri testiranju Beclin1.

Zaključak: PD-L1, p62, LC3 i Beclin1 ekspresija je najizraženija u ovarijalnim karcinomima. Serozni histološki tip (HGSC) karcinoma jajnika pokazuje najizraženiju PD-L1 ekspresiju i to u višim FIGO stadijumima tumorske bolesti. Značajno viša PD-L1 imunoekspresija postoji u invazivnim nego u centralnim područjima HGSC. Dokazana je pozitivna korelacija višeg stepena ekspresije PD-L1 u centralnim područjima HGSC sa stepenom reaktivnog intratumorskog limfocitnog infiltrata. Nije bilo značajnih razlika u imunoekspresiji ni jednog od markera autofagije između centralnih i invazivnih područja OK. Postoji pozitivna međusobna korelacija u stepenu imunoekspresije markera p62 i LC3, dok ta korelacija ima negativan smer kada se testira povezanost pomenutih markera sa imunoekspresijom Beclin1. Odnos ekspresije PD-L1 prema ekspresiji p62, LC3 i Beclin1 ne menja se s obzirom na histološki tip OK, FIGO stadijum, kao ni s obzirom na ostale prognostički značajne patohistološke parametre tumorske bolesti. Istovremeno postojanje i međusobna povezanost ekspresije PD-L1 i markera autofagije ukazuje na postojanje simultane aktivacije imunosupresivnih antitumorskih i tumorskih autofagnih procesa u OK.

Cljučne reči: tumori jajnika; autofagija; PD-L1; p62; LC3; Beclin1

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Humana reprodukcija

UDK broj:

Expression of immunosuppression markers in epithelial ovarian tumors and their association with autophagy markers

Abstract

Introduction: Epithelial ovarian tumors are 2/3 of all ovarian tumors. Their origin is from mesothelial cells that line the surface of the ovaries, ie. of epithelial Mullerian type cells from uterine tube. In relation to the ability of epithelial proliferation, they are divided into benign, malignant and atypically proliferating (APT) epithelial ovarian tumors. Ovarian cancer is the malignant gynecological tumor with the highest mortality rate. Despite the standard therapy protocols, patients in advanced stages of the disease show poor treatment results. Ovarian cancer can very effectively suppress the host immune responses. Tumor cells with expressed PD-L1 protein can activate the immunosuppressive regulatory mechanism and protect themselves from the cytotoxic T-lymphocytes. Autophagy is very important mechanism in tumorigenesis, as well as in the response of tumors to various form of antitumor therapy. Inhibition of the PD-1/PD-L1 mechanism has been found to stimulate autophagy in tumor cells and allow them to survive.

Aim: Analysis of the expression of PD-L1 molecules and markers of autophagy p62, LC3 and Beclin1 in tumor cells of epithelial ovarian tumors, their interrelationship and association with different clinical and histopathological parameters.

Methodology: The study included 328 patients who underwent surgery removal of epithelial ovarian tumors in the period from 2017. to 2019. year, at the Clinic for Gynecology and Obstetrics of the University Clinical Center of Serbia in Belgrade. Epithelial ovarian cancer (EOC) had 122 patients, APT tumors 42 patients, while the control group consisted of 164 patients with epithelial benign ovarian tumors (BOT). After standard histological processing, vital parts of the tumor were sampled from the tumor tissue blocks, and were transferred to the recipient paraffin blocks using a 3 mm puncture needle, thus forming tissue microarray. From ovarian cancers central and invasive tumor parts with the most pronounced lymphocytic reaction were sampled. Immunohistochemical analysis with antibodies PD-L1, p62, LC3 and Beclin1 was performed at the Institute of Pathology, Medical Faculty in Belgrade. Positive tumor cells were counted on the x400 power field and their percentage from the total number of tumor cells was determined. Any convincing partial or complete linear membrane PD-L1 staining and cytoplasmic p62, LC3 and Beclin1 staining in at least one viable tumor cell we consider as positive reaction. Four categories of expression were defined: negative (0) without positive tumor cells or with individual positive cells (<1%); low (1+) expression with less than 10% positive tumor cells; moderate (2+) expression with 10-50% positive tumor cells and strong (3+) expression with more than 50% expression. Only tumors with moderate and strong positivity are considered as high expression of the analyzed markers. Statistical analysis includes descriptive and analytical methods using appropriate statistical tests that are interpreted at the level of significance of the null hypothesis of $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences 20.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Results: The expression of PD-L1 marker is more pronounced in EOC compared to APT and BOT. Serous EOCs showed the most pronounced high PD-L1 expression (79.6%), statistically significantly higher ($p < 0.001$) compared to mucinous (30.0%) and endometrioid (33.3%) cancers. High PD-L1 expression was significantly more pronounced ($p = 0.007$) in high grade serous carcinomas (HGSC) of the ovary (83.5%) than in low grade serous carcinomas (LGSC) of the ovary (50.0%). Higher FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) stages of tumor disease (III and IV) show significantly more pronounced high PD-L1 expression compared to lower FIGO stages (95.2%; 23.1%).

Invasive parts of ovarian cancers show more pronounced PD-L1 expression compared to central ones ($p < 0.001$). HGSC in invasive parts showed a significant frequency of high (96.7%) PD-L1 expression compared to the central parts. LGSC, mucinous, and endometrioid ovarian cancers did not show significant differences in PD-L1 expression between invasive and central carcinoma parts. There is a significantly higher frequency of high PD-L1 expression in the central parts of the cancer (84.3%) with the presence of intratumoral lymphocyte infiltrate ($p = 0.003$). The expressions of p62, LC3 and Beclin1 markers were more pronounced in EOC compared to their expressions in APT tumors and BOT ($p < 0.001$). Expressions of markers p62, LC3 and Beclin1 show a statistically significant positive correlation between central and invasive parts of ovarian cancers ($p < 0.001$). There is a strong positive correlation between p62 and LC3 marker expressions. Beclin1 marker expression is negatively correlated with p62 and LC3 expression. Expressions of p62 and LC3 markers were significantly present in patients with HGSC histological type in contrast to Beclin1 expression, which was more present in the remaining histological types of ovarian cancer. Higher expressions of p62 and LC3 markers were observed in advanced tumor stages compared to lower ones, which is different from Beclin1 expression. Tumor differentiation (grade) shows a positive correlation with p62 and LC3 expressions and a negative correlation with Beclin1 expression. The frequencies of PD-L1 expression categories were significantly different from the expressions of p62 and LC3 autophagy markers in both central and invasive parts of the EOC, while the level of Beclin1 expression was not significantly different from the expression levels of PD-L1 marker. The expression of PD-L1 was not significantly different from the expression levels of autophagy markers in all histological types of ovarian cancers.

Conclusion: PD-L1, p62, LC3 and Beclin1 expressions are most pronounced in epithelial ovarian cancers. Serous histological type (HGSC) of ovarian cancer shows the most pronounced PD-L1 expression in higher FIGO stages of tumor disease. Significantly higher PD-L1 expression is present in invasive parts of HGSC histological type of ovarian cancers compared to central parts. The association of higher PD-L1 expression in the central parts of the HGSC with a more pronounced intratumoral lymphocyte infiltrate has been demonstrated. Expressions of markers p62, LC3 and Beclin1 did not show significant differences between central and invasive parts of ovarian cancers. There is a positive correlation between the expression of p62 and LC3 markers and a negative correlation with the expression of Beclin1 marker. Expressions of p62 and LC3 markers are significant in the HGSC histological type of ovarian cancers in contrast to Beclin1 expression which is more common in other histological types. Histological type of ovarian cancer, FIGO stage and other prognostically important histopathological parameters did not show a significant difference in the presence of PD-L1 expression in relation to the expression of p62, LC3 and Beclin1 markers. The combined presence of expression of PD-L1 and p62, LC3 and Beclin1 markers suggests simultaneous activation of immunosuppressive antitumor and intratumoral autophagy processes in ovarian cancer cells.

Key words: ovarian tumors; autophagy; PD-L1; p62; LC3; Beclin1

Scientific field: Medicine

Special scientific field: Human reproduction

UDK number:

Sadržaj:

1. Uvod.....	1
1.1. Epitelni tumori jajnika (ovarijalni karcinom)	1
1.1.1. Klinička prezentacija ovarijalnog karcinoma	3
1.1.2. Histološki tipovi ovarijalnog karcinoma	3
1.1.3. Genetske karakteristike ovarijalnog karcinoma	6
1.1.4. Dijagnostika ovarijalnog karcinoma	7
1.1.5. Terapija ovarijalnog karcinoma	8
1.2. Uloga imunološkog antitumorskog odgovora kod ovarijalnog karcinoma	9
1.3. PD-L1/PD-1 imunosupresivni regulatorni mehanizam	11
1.4. Imunoterapija u ovarijalnom karcinomu	13
1.5. Autofagija	15
1.5.1. Faze i mehanizam procesa autofagije	15
1.5.2. Autofagija i tumor.....	17
1.5.3. Terapija vezana za proces autofagije	19
1.5.4. Značajni markeri u procesu autofagije.....	21
1.6. Značaj udruženih mehanizama imunosupresije i autofagije.....	22
2. Ciljevi istraživanja	24
3. Materijali i metode	25
3.1. Uzorkovanje i standradna histološka obrada tkiva.....	25
3.2. Formiranje tkivnog mikroniza (<i>tissue microarray</i> - TMA).....	25
3.3. Metode imunohistohemijske analize	26
3.3.1. Evaluacija ekspresije analiziranih markera	27
3.4. Statistička analiza.....	27
4. Rezultati	28
4.1. Demografski, klinički i patohistološki parametri.....	28
4.2. Rezultati analize ekspresije PD-L1 markera.....	32
4.2.1. Poređenje PD-L1 ekspresije u centralnim i invazivnim delovima ovarijalnih karcinoma.....	36
4.3. Rezultati analize ekspresije p62 markera	40

4.4. Rezultati analize ekspresije LC3 markera	43
4.5. Rezultati analize ekspresije Beclin1 markera	46
4.6. Poređenje ekspresija markera autofagije (p62, LC3 i Beclin1)	49
4.7. Poređenje ekspresije PD-L1 receptora i markera autofagije	51
4.7.1. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije (p62, LC3, Beclin1) u centralnim delovima ovarijalnih karcinoma	51
4.7.2. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije (p62, LC3, Beclin1) u invazivnim delovima ovarijalnih karcinoma	52
4.7.3. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u odnosu na kliničke i patohistološke parametre.....	53
5. Diskusija	62
6. Zaključci	76
7. Literatura	77

1. UVOD

1.1. Epitelni tumori jajnika (ovarijalni karcinom)

Epitelni tumori jajnika čine oko 90% svih ovarijalnih tumora. Poreklo vode od ćelija mezotela koje oblažu površinu jajnika tj. od epitelnih *Mullerian type* jajovoda. U odnosu na sposobnost proliferacije epitela, dele se na benigne, maligne i atipično proliferišuće tumore (APT) jajnika (1, 2).

Epitelni benigni ovarijalni tumori (BOT) su relativno česti tumori odlične prognoze. Retko progrediraju u maligne tumore, osim ako nemaju genetsku predispoziciju kao što je mutacija p53 gena (1).

Atipično proliferišući su ovarijalni tumori epitelnog porekla niskog malignog potencijala učestalosti oko 15%. Imaju izraženiju sposobnost proliferacije u odnosu na BOT. Obično se dijagnostikuju u ranim FIGO (Internacionalano udruženje ginekologa i akušera) stadijumima, kod mlađih pacijentkinja. Najčešće su bez nekroze i ne pokazuju znakove invazije. Dijagnostika APT tumora podrazumeva prisustvo atipije i proliferacije najmanje 10% epitela tumora. Tumori koji pokazuju manje od 10% izmenjenog epitela definišu se kao cistadenomi sa fokalnom proliferacijom i pokazuju više benigno biološko ponašanje. Prognoza bolesti kod ovih pacijentkinja je daleko bolja u odnosu na ovarijalne karcinome (OK) (1).

Ovarijalni karcinomi spadaju u grupu malignih ginekoloških tumora sa najvećom stopom mortaliteta širom sveta. Smatra se da je osmi najčešći po oboljevanju i osmi najčešći uzrok smrti od karcinoma kod žena (3). Procenjuje se da je u 2020. godini registrovano 313 959 novih slučajeva obolelih od karcinoma ovarijuma širom sveta, sa 207 252 smrtnih ishoda (3). OK često metastaziraju transcelomski, zbog čega su česti tumorski depoziti u omentumu kao i prisustvo ascitesa (1).

Zbog vrlo nespecifičnih simptoma i ograničenih metoda skrininga, dijagnoza se obično postavlja u uznapredovalim FIGO stadijumima III i IV (**Tabela 1**). Pacijentkinje u ranom stadijumu bolesti (FIGO I) imaju oko 85% desetogodišnjeg preživljavanja. Desetogodišnje preživljavanje se smanjuje na 18% u slučaju regionalno proširene bolesti (stadijum III) ili ukoliko postoje udaljene metastaze kod stadijuma IV (4, 5).

Imajući u vidu navedene podatke dolazi se do zaključka da je karcinom ovarijuma, uprkos dosadašnjim istraživanjima i savremenim modalitetima lečenja i dalje bolest sa niskom stopom preživljavanja, bez adekvatnih preventivnih mera i postupaka koji bi doveli do ranije dijagnoze, u ranijim stadijumima bolesti.

Tabela 1. FIGO klasifikacija za stadiranje ovarijalnog karcinoma (2018 . godina)

I	Tumor ograničen na jajnike ili tube
IA	Tumor ograničen na jedan jajnik (intaktna kapsula) ili tube; nema tumora na površini jajnika ili tube; nema malignih ćelija u ascitesu ili u peritonealnoj lavaži
IB	Tumor ograničen na oba jajnika (intaktna kapsula) ili tube; nema tumora na površini jajnika ili tube; nema malignih ćelija u ascitesu ili u peritonealnoj lavaži
IC	Tumor ograničen na jedan ili oba jajnika ili tube sa nekom od sledećih karakteristika
IC1	Jatrogeno rasejavanje tumorskih ćelija intraoperativno
IC2	Ruptura kapsule jajnika pre operacije ili prisustvo tumora na površini jajnika ili tube
IC3	Maligne ćelije prisutne u ascitesu ili u peritonealnoj lavaži
II	Tumor zahvata jedan ili oba jajnika/tube sa diseminacijom tumora unutar karlice
IIA	Diseminacija tumora i/ili prisustvo implanta na uterusu i/ili tubama i/ili jajnicima
IIB	Diseminacija tumora na druga intraperitonealna tkiva karlice
III	Tumor zahvata jedan ili oba jajnika/tube; ili je primarni peritonealni karcinom, sa citološki ili histološki potvrđenom diseminacijom po peritoneumu izvan karlice i/ili sa metastazama u retroperitonealnim limfnim čvorovima
IIIA	Metastaze u retroperitonealnim limfnim čvorovima sa ili bez mikroskopski verifikovanom peritonealnom diseminacijom izvan karlice
IIIA1	Pozitivni retroperitonealni limfni čvorovi samostalno (citološki ili histološki potvrđeno)
IIIA1(i)	Metastaze ≤10 mm u najvećoj dimenziji*
IIIA1(ii)	Metastaze >10 mm u najvećoj dimenziji*
IIIA2	Mikroskopska ekstrapelvična (iznad granice karlice) peritonealnodiseminacija sa ili bez pozitivnih retroperitonealnih limfnih čvorova
IIIB	Makroskopske peritonealne metastaze iznad granice karlice ≤2 cm u najvećoj dimenziji, sa ili bez metastaza u retroperitonealnim limfnim čvorovima
IIIC	Makroskopske peritonealne metastaze iznad granice karlice >2 cm u najvećoj dimenziji, sa ili bez metastaza u retroperitonealnim limfnim čvorovima**
IV	Udaljene metastaze isključujući peritonealne metastaze
IVA	Efuzija pleure sa pozitivnim citološkim nalazom
IVB	Metastaze u organe izvan trbušne duplje (uključujući preponske limfne čvorove i limfne čvorove izvan trbušne duplje)

* Odnosi se na dimenziju tumora, ne na dimenziju limfnog čvora.

** Uključuje diseminaciju tumora na kapsulu jetre i slezine bez njihove parenhimske infiltracije.

*** Parenhimske metastaze su u stadijumu IVB. Tumor koji infiltriše zid creva zahvatajući mukozu pripada stadijumu IVB. Transmuralna infiltracija visceralnih struktura je takođe u stadijumu IVB.

1.1.1. Klinička prezentacija ovarijalnog karcinoma

Ovarijalni karcinom se najčešće prezentuje kao uznapredovala bolest, s obzirom da je rani stadijum bolesti uglavnom asimptomatski. Uobičajeni simptomi uključuju distenziju abdomena, promene u pražnjenju creva, vaginalno krvavljenje ili bol. Simptomi pritiska, kao što su učestalo mokrenje ili opstipacija, mogu biti posledica velike pelvične mase. Udruženost simptoma napetog, uvećanog abdomena i urinarnih tegoba primećeno je kod 43% pacijentkinja sa suspektom dijagnozom ovarijalnog karcinoma, od čega su samo kod 8% svih pacijentkinja ovi simptomi bili vezani za druge bolesti. Jedan od najvažnijih kliničkih znakova ovarijalnog karcinoma je fiksirana, nejasno ograničena pelvična masa, koja se najbolje palpira vaginalnim pregledom. U uznapredovalim kliničkim oblicima mogu se dijagnostikovati ascites, pleuralna efuzija, palpabilni limfni nodusi. Takođe se može detektovati paraneoplastični sindrom koji najčešće podrazumeva hiperkacemiju uslovljenu supstancama sličnim parathormonu koje izlučuju tumorske ćelije (5).

1.1.2. Histološki tipovi ovarijalnog karcinoma

Ovarijalni karcinom pokazuje nekoliko histoloških tipova koji imaju različite faktore rizika, ćelijsko poreklo, molekularne mehanizme nastanka tumora, kliničku sliku, prognozu i terapiju (**Slika 1**). Tri najzastupljenija histološka tipa epitelnog ovarijalnog karcinoma su: serozni, mucinozni i endometrioidni. Svetloćelijski (*clear cell*) karcinom je takođe čest u većim dijagnostičkim centrima. Redi histološki tipovi podrazumevaju tranziciocelularni (*Brenner-ov*) karcinom i još ređe sitnoćelijske (*small cell*) karcinome. Karcinosarkom, mešoviti tumor sa udruženim prisustvom maligne epitelne i mezenhimalne komponente, je relativno redak tumor (6).

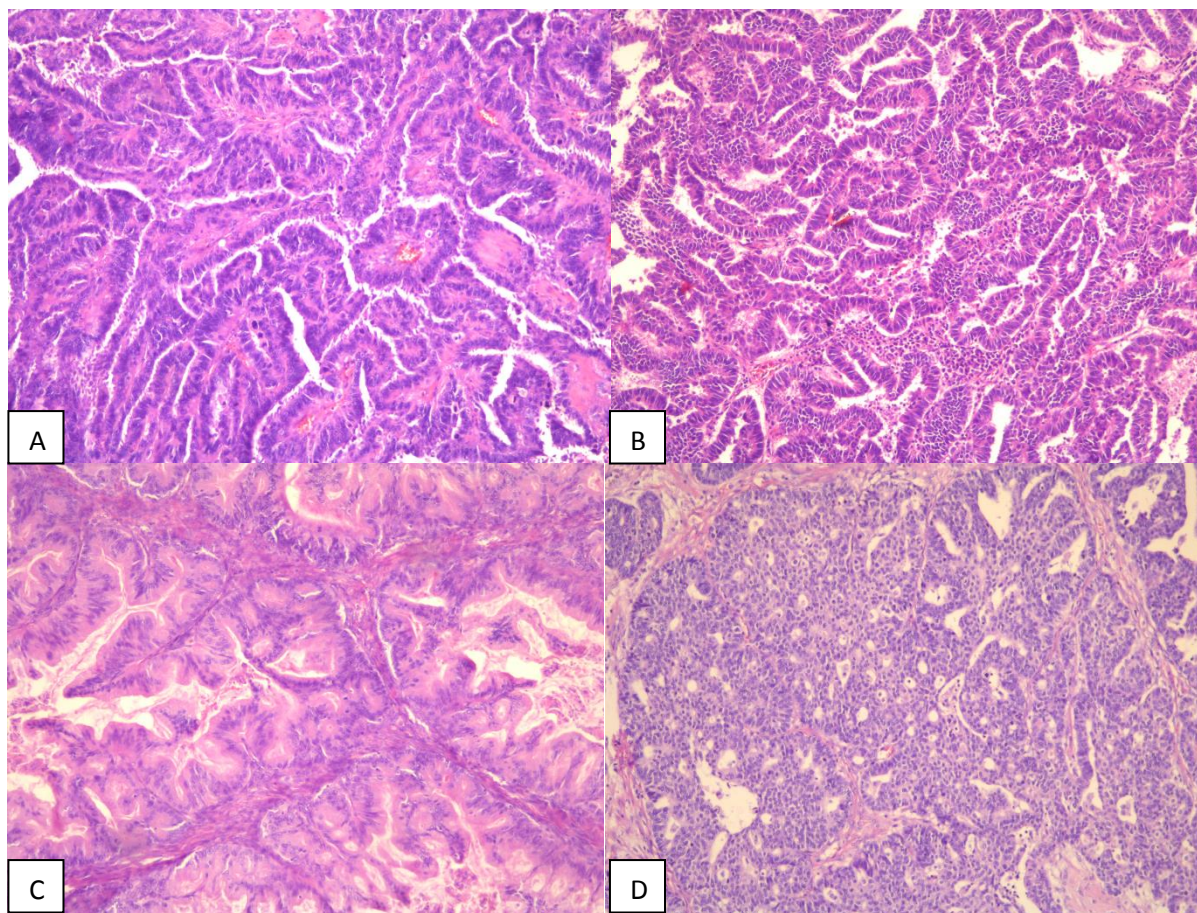
Serozni visokogradusni „*high grade*“ ovarijalni karcinom (HGSC) je najčešći histološki tip karcinoma jajnika (oko 70% svih ovarijalnih karcinoma). To je karcinom sa lošom prognozom koji se u oko 75% slučajeva dijagnostikuje u FIGO stadijumu III ili IV. Petogodišnje preživaljavanje kod takvih pacijentkinja je 40% (7). *Low grade serous carcinoma* (LGSC) pokazuje prognostički vrlo različite karakteristike i posledično primenu terapijskih postupaka u lečenju. Po nekim autorima LGSC bi mogao biti izdvojen kao poseban histološki tip tumora. HGSC najverovatnije ima poreklo u epitelu jajovoda, koji nakon maligne transformacije zahvata parenhim jajnika. Diferencijalno dijagnostički izazov i tema daljih istraživanja je razlikovanje HGSC porekla tube, primarnog peritonealnog porekla i temeljnije ispitivanje mogućeg porekla mezotela sa površine jajnika (6).

Mucinozni ovarijalni karcinom je redak primarni tumor jajnika (12%). Najčešće predstavlja metastaze gastrointestinalnog porekla (77%). Karakterišu ga svetlije tumorske ćelije ispunjene mucinom, intestinalnog tj. endocervikalnog histološkog podtipa. Pokazuje dve najčešće forme rasta: ekspanzivnu i infiltrativnu. Ekspanzivnu formu rasta karakterišu umnoženi, konfluentni mucinozni neoplastični acinusi, oskudne okolne strome u kojoj nema očiglednih znakova invazije. Infiltrativni način rasta pokazuje jasnu infiltraciju strome, često dezmozoplastično izmenjene. Infiltrativni način rasta je povezan sa lošijom prognozom olesti u odnosu na ekspanzivni. Često se uočava dosta ekstracelularnog mucina koji može biti ekstenzivan i može se širiti unutar peritonealne duplje, što ukazuje na najverovatnije primarno poreklo apendiksa (*pseudomyxoma peritonei*). Preživljavanje pacijentkinja sa mucinoznim ovarijalnim karcinomom je u velikoj meri određeno stadijumom bolesti. Za razliku od FIGO I

stadijuma u kome je preživljavanje oko 92%, u FIGO II i višim stadijumima bolesti ono drastično opada na oko 32% i manje (6, 8).

Endometrioidni karcinom jajnika čini oko 10-15% svih primarnih ovarijalnih karcinoma. Najčešće se dijagnostikuje u ranim stadijumima tumorske bolesti, nižeg gradusa. Preživljavanje pacijentkinja sa endometrioidnim ovarijalnom karcinom u FIGO I stadijumu je oko 95%, dok je u uznapredovalim stadijumima oko 51%. Endometrioza i endometriotične ciste su vrlo često udružene sa endometrioidnim karcinomima, zbog čega se smatra da imaju ulogu u patogenezi ovih tumora (6, 9).

Zastupljenost histološkog gradusa bolesti je takođe zastupljenija kod određenih histoloških tipova. Serozni histološki tip ovarijalnog karcinoma je najčešće visokogradusni „*high grade*“, sa vrlo lošom prognozom. Mucinozni ovarijalni karcinomi najčešće imaju niži gradus i stadijum bolesti i udruženi su sa boljim preživljavanjem u odnosu na ostale tipove (6, 10, 11).



Slika 1. Najčešći histološki tipovi ovarijalnih karcinoma. A. High grade serozni karcinom (x100), B. Low grade serozni karcinom (x100), C. Mucinozni karcinom (x100), D. Endometrioidni karcinom (x100).

1.1.3. Genetske karakteristike ovarijalnog karcinoma

Definisane su genetske razlike unutar histoloških tipova ovarijalnog karcinoma. Serozni karcinomi uglavnom pokazuju mutaciju *Breast cancer 1 i 2* (BRCA1 i BRCA2) gena, dok mucinozni karcinomi uglavnom imaju KRAS mutacije (2, 5). Pacijentkinje sa BRCA2 mutacijama imaju bolje preživljavanje u odnosu na one sa BRCA1, najverovatnije zbog veće senzitivnosti takvih pacijentkinja na primenu platinskih hemioterapeutika. Brojni drugi geni regulatori popravke DNK mogu učestvovati u nastanku ovarijalnog karcinoma kao što su RAD51C, RAD51D, BRIP1, BARD1, PALB2 geni regulatori Fanconi anemija- BRCA signalnog puta (5).

Nasledni kancerski sindrom Lynch podrazumeva najčešće ovarijalni, endometrijalni i kolorektalni karcinom. Pacijentkinje sa Lynch sindromom imaju povećani rizik za nastanak ovarijalnog karcinoma. Lynch sindrom karakterišu nasledne mutacije gena popravke DNK: MLH1, PMS2, MSH2, MSH6. Svetloćelijski i endometrioidni histološki tip ovarijalnog karcinoma često se nalaze u sklopu Lynch sindroma (2, 5).

HGSC najčešće sadrži mutaciju p53 gena čija se imunohistoheмиjska ekspresija standardno analizira u dijagnostici. Ekspresija p53 markera je značajna kod HGSC izuzev kod „*wild type*“ forme gena kada ova ekspresija izostaje. Hipermetilacija promotora BRCA1 gena može se detektovati kod HGSC. Poremećaji signalnih puteva PI3K, RAS–MEK, Notch, *forkhead box protein M1* (FOXM1), kao i veliki broj kopija somatskih mutacija gena uključenih u regulaciju ovih puteva pronađeni su u HGSC. Mutirani geni bitni zbog mogućeg ciljanog terapijskog delovanja na njih su AURKA, ERBB3, CDK2, MTOR, BRD4, MYC. Analizom profila ekspresije gena HGSC je podeljen u četiri podtipa: diferentovan, imunoreaktivan, mezenhimni i proliferativni, pri čemu svaki podtip pokazuje drugačiji ishod bolesti. Svetloćelijski karcinom jajnika najčešće pokazuje mutacije ARID1A, PIK3CA, PTEN gena. BRAF i KRAS mutacije česte su kod LGSC. Visokogradusni endometrioidni ovarijalni karcinomi imaju slične genetske mutacije kao HGSC. Najčešće mutacije zabeležene kod mucinoznih ovarijalnih karcinoma pored KRAS su: BRAF, CDKN2A, RNF43, ELF3, GNAS, ERBB3, KLF5 (5).

Svetloćelijski ovarijalni karcinomi sa genetskom mikrosatelitskom nestabilnošću imaju specifične imunološke karakteristike. Kod pacijentkinja obolelih od ove vrste tumora detektovano je izraženije prisustvo CD8+ T-limfocita i izraženija ekspresija *programmed death 1* (PD-1) markera na tumor infiltrišućim limfocitima, ukazujući na moguće značajnije efekte lečenja inhibitorima *programmed death 1-programmed death ligand 1* (PD-1/PD-L1) mehanizma u odnosu na HGSC i svetloćelijski karcinom jajnika bez ovog genetskog defekta (7).

1.1.4. Dijagnostika ovarijalnog karcinoma

Ultrazvučnim pregledom pacijentkinja sa ovarijalnim karcinomom najčešće se detektuje solidnocistična, nepravilna tumorska masa u projekciji adneksa. Cistična tumorska komponenta je uglavnom multilokularna, anehogenog do hipoehogenog sadržaja. Magnetnom rezonancom i kompjuterizovanom tomografijom preciznije se definišu izmenjene anatomske strukture i detektuju mogući metastatski tumorski depoziti.

Dijagnostika i praćenje terapijskih efekata lečenja ovarijalnog karcinoma podrazumevaju merenje koncentracije tumorskog markera *Cancer Antigen 125* (CA125) u serumu obolelih pacijentkinja. Kod više od 80% pacijentkinja sa ovarijalnim karcinomom vrednosti CA125 su povišene (>35 IU/L) i to uglavnom u uznapredovalim stadijumima bolesti. U ranim stadijumima bolesti samo 50% pacijentkinja ima povišene vrednosti CA125 u poređenju sa 90% pacijentkinja sa uznapredovalom bolešću, što ukazuje da CA125 nije pouzdan *screening* marker za ranu detekciju ovarijalnog karcinoma (11).

Tumorski marker CA125 nije u potpunosti specifičan za dijagnozu ovarijalnog karcinoma, s obzirom da 1% zdrave populacije i 6% pacijenata sa benignim oboljenjima, kao što je endometriozna, trudnoća, inflamatorni procesi u maloj karlici, imaju vrednosti CA125 iznad normalnih opsega. Povišene vrednosti CA125 markera se najčešće detektuju kod seroznog i endometrioidnog tipa ovarijalnog karcinoma, dok je kod mucinoznih, svetloćelijskih i „borderline“ tumora nivo CA125 obično diskretno promenjen. Mnogi drugi karcinomi mogu takođe pokazati povišene vrednosti CA125 serumskog markera kao što su: karcinom endometrija, dojke, pankreasa, pluća, gastrointestinalnog trakta. Vrednosti CA125 markera su posebno varijabilne kod premenopauzalnih žena, obzirom na moguć porast nivoa u periodu ovulacije. Kod postmenopauzalnih žena sa suspektom tumorskom masom, senzitivnost CA125 markera u prognostičkom smislu je 98%. *Human Epididymis Protein 4* (HE4) marker u odnosu na CA125 ima veću senzitivnost kod premenopauzalnih žena i u ranijim stadijumima ovarijalnog karcinoma. Udruženom analizom markera CA125 i HE4 dobija se bolja senzitivnost u dijagnostici ovarijalnog karcinoma. ROMA index i index malignosti su takođe neizostavni dijagnostički parametri ovarijalnog karcinoma. ROMA index definiše udruženo tumačenje serumskih koncentracija CA125 i HE4 markera, kao i uticaj reproduktivne dobi. Index malignosti kombinuje vrednosti CA125 markera u serumu sa ultrazvučnim nalazom i reproduktivnom dobi pacijentkinje. Ovi indexi nastali kombinacijom različitih prognostičkih parametara imaju dosta veću dijagnostičku senzitivnost u odnosu na pojedinačne markere (5, 11-13).

1.1.5. Terapija ovarijalnog karcinoma

Hirurške procedure su terapija izbora u lečenju ovarijalnog karcinoma. U cilju preciznog određivanja stadijuma bolesti definisani su protokoli na osnovu kojih se biopiraju i hirurški tretiraju anatomske strukture od značaja. Hirurške procedure za određivanje stadijuma bolesti (stejdžing) pre svega podrazumevaju histerektomiju sa bilateralnom adnektomijom, zatim infrakoličnu omentektomiju, ekstirpaciju limfnih nodusa (ilijačno i paraaortalno), multiple biopsije peritoneuma iz suspektnih delova. Postupkom peritonealne lavaže dobija se citološki dijagnostički materijal (5, 14).

Ukoliko se radi o ranom ovarijalnom karcinomu, moguće je primeniti konzervativni hirurški pristup. Ovo je naročito važno za mlade žene koje žele da očuvaju fertilitet. Međutim, indikacije za ovakvu poštenu hirurgiju kojom se otklanjaju samo adneksa sa jedne strane, omentum i istostrane limfne žlezde, moguće je promeniti samo kod atipično proliferišućeg tumora ili kod dobro diferentovanog tumora epitelnog tipa stadijuma Ia ukoliko je intracističan, nerupturiran, neadherentan i ako je negativna peritonealna lavaža.

Kod uznapredovalih stadijuma bolesti zlatni standard je primarna citoreduktivna hirurgija ukoliko stanje pacijentkinje i proširenost bolesti dozvoljavaju ekstenzivnu hirurgiju. Maksimalna citoredukcija je jedan od najvažnijih prognostičkih faktora kod pacijentkinja sa uznapredovalim ovarijalnim karcinomom. Primarni cilj operativnog postupka ima za cilj da ukloni onoliko tumora koliko je moguće učiniti bezbedno po pacijentkinju, to jest da ostavi minimalnu ili nikakvu makroskopsku rezidualnu bolest.

Primena adjuvantne hemioterapije na bazi platine kod pacijentkinja u ranom stadijumu bolesti zavisi od gradusa i histološkog tipa tumora. Mnoge pacijentkinje u I stadijumu bolesti, tumora gradusa 1 ne primaju hemioterapiju nakon operacije ukoliko je hirurški tačno određen stadijum bolesti. Međutim pacijentkinje sa karcinomom gradusa 2 i većeg, kao i one sa unapred definisanim visokogradusnim histološkim tipovima karcinoma (HGSC i svetloćelijski karcinom), dobijaju sistemsku adjuvantnu platinsku hemioterapiju. Kod uznapredovalih stadijuma bolesti, pored platinskih hemioterapijskih lekova dodatno se primenjuje Paclitaxel, kao i Cisplatina intraperitonealno. Istražuju se efekti udružene primene platinskih lekova (Cisplatina, Carboplatina), taksana (Paclitaxel, Docetaxel) kao i inhibitora angiogeneze (Bevacizumab). Udruženje *European Medicines Agency* (EMA) je 2011. godine odobrilo upotrebu Bevacizumaba u kombinaciji sa Carboplatinom i Paclitaxelom kod pacijentkinja sa novodijagnostikovanim, uznapredovalim ovarijalnim karcinomom, pri čemu su efekti lečenja zadovoljavajući (15).

Novija terapijska rešenja podrazumevaju *poly ADP-ribose polymerase* (PARP) inhibitore i inhibitore angiogeneze, posebno efikasne kod pacijentkinja sa relapsom bolesti. PARP protein pomaže tumorskim ćelijama prilikom popravke DNK. Kancerske ćelije sa mutiranim BRCA genima već imaju oštećen mehanizam popravke DNK. Inhibiranjem funkcije PARP molekula ćelije u potpunosti gube mogućnost reparacije DNK i umiru. PARP inhibitori, konkretno Olaparib u samostalnoj primeni, pokazao je povoljne terapijske efekte kod 30% pacijentkinja sa relapsom ovarijalnog karcinoma, pri čemu su najbolji rezultati bili u slučajevima sa prisutnim BRCA mutacijama, kod pacijentkinja osetljivih na platinske hemioterapeutike (16).

1.2. Uloga imunološkog antitumorskog odgovora kod ovarijalnog karcinoma

Uloga imunološkog sistema u nastanku karcinoma je izuzetno značajna ali i dalje nedovoljno jasna. Antitumorski imunološki odgovor je sačinjen od serije uzastopnih procesa koji čine takozvani *Cancer-Immunity Cycle* (17). Inicijalno dolazi do oslobađanja tumorskih antigena u ekstracelularni prostor pri čemu oni postaju dostupni dendritičnim ćelijama koje ih fagocituju, prerađuju i eksprimiraju na svojoj površini u sklopu molekula histokompatibilnosti (MHC I i MHC II). Nakon prepoznavanja prezentovanih tumorskih antigena na dendritičnim ćelijama, sledi aktivacija specifičnih limfocita, uz udruženo dejstvo brojnih citokina i faktora okoline. Aktivirani citotoksični T-limfociti su najangažovanija populacija efektnih imunoloških ćelija koje putem krvi dospevaju do ciljanih tumorskih ćelija i nakon prepoznavanja ih uništavaju svojim intracelularnim enzimima i međureceptorskim signalima. Na taj način se oslobađa još više novih tumorskih antigena koji putem istog procesa dalje indukuju antitumorski imunološki odgovor (17).

Kod pacijenata obolelih od karcinoma, neki od prethodno opisanih delova ciklusa izostaje. Nепрепозnavanje tumorskih antigena, poremećena uloga dendritičnih ćelija sa posledično neadekvatnom prezentacijom tumorskih antigena, mogu dovesti do aktiviranja pogrešnih ćelijskih populacija koje nemaju odgovarajuću ulogu u odbrani domaćina. U takvim situacijama vrlo često dolazi do aktiviranja mnogo većeg broja regulatornih T-limfocita (Treg), sa vrlo slabom zastupljenošću efektnih T-limfocita. Treg-limfociti suprimiraju imunološki odgovor domaćina i njihovo prisustvo je u pozitivnoj korelaciji sa lošom prognozom. Zastupljenost Treg-limfocita je veća u rekurentnim karcinomima u odnosu na primarne tumore. Po nekim istraživanjima Treg-limfociti su jači prognostički faktor u odnosu na histopatološki tip karcinoma (17-19). Takođe postoji populacija regulatornih B-limfocita označena kao *tumor-induced B regulatory cells* (tBregs) koja nastaje od uobičajenih B-limfocita kao odgovor na još neprepoznate tumorske antigene. Smatra se da je funkcija tBreg limfocita podsticanje stvaranja Treg-limfocita aktivacijom signalnog puta TGF- β i receptora TGF- β tip I. Veća koncentracija tBreg-limfocita povezana je sa većim metastatskim potencijalom pojedinih tumora (20).

Supresija antitumorskog imunološkog odgovora domaćina je jedan od glavnih mehanizama pomoću kojeg tumorske ćelije obezbeđuju svoje preživljavanje. Dok imunološki sistem ima ulogu da ograničava rast tumora, imunosupresivne ćelije u mikrookruženju tumora, kao što su supresorne ćelije mijeloidnog porekla (*myeloid-derived suppressor cells* - MDSC), ćelije prirodne ubice (*natural killer cells* - NK), regulatorne T ćelije, makrofagi udruženi sa tumorom (*tumor associated macrophages* - TAM) i druge, mogu dodatno suprimirati imunološki sistem i na taj način ubrzati rast tumora. Takve ćelije redukuju efikasnost imunoterapije, a istraživanje njihovih interakcija i uloga može doprineti boljim terapijskim rešenjima (20-22).

TAM ćelije imaju drugačije podtipove u različitim tumorima. Kod karcinoma jajnika prisustvo TAM ćelija povezano je sa lošijom prognozom bolesti. Tumorsko mikrookruženje sadrži citokine IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β koji mobilizuju TAM ćelije i dovode do stimulacije imunosupresije. Prisutna je pozitivna korelacija između serumskih nivoa citokina IL-6 i IL-10 i progresije ovarijalnog karcinoma. IL-6 indukuje ekspresiju receptora za IL-8 koja dovodi do aktivacije Treg-limfocita i imunosupresije kod tumora koji sekretuju IL-8. TAM ćelije takođe aktiviraju Treg-limfocite i na taj način dodatno remete efektni T-limfocitni imunološki odgovor. Povišene koncentracije različitih proteaza u tumorskom okruženju koje promoviraju

nastanak metastaza, kao i lučenje proangiogenih faktora značajnih za tumorski rast, stimulirani su TAM ćelijama. Imunosupresivni uticaj MDSC ćelija i njihova koncentracija u perifernoj krvi povezani su sa većom agresivnošću tumora i višim stadijumom bolesti. MDSC ćelije ostvaruju svoj imunosupresivni uticaj posredstvom enzima uključenih u metabolizam arginina i inhibiraju aktivnost NK ćelija. Takođe promoviraju rast tumora lučenjem proangiogenih faktora kao što je *Vascular endothelial growth factor* (VEGF). Mnogi tumori formiraju egzosome, male intracelularne vezikule sa značajnom ulogom u izbegavanju imunološkog sistema koje svoju imunosupresivnu funkciju ostvaruju inhibicijom efektivnih T-limfocita i NK ćelija, serijom složenih molekularnih procesa, kao i posredstvom promocije stvaranja MDSC ćelija u mikrookruženju tumora. Fibroblasti u tumorskom mikrookruženju lučenjem svojih medijatora vrše supresiju efektorskih T-limfocita koji gube sposobnost da migriraju do tumorskih ćelija i ostvare svoje citotoksične funkcije (19, 20, 23, 24).

Lokalna infiltracija tumor antigen specifičnim T-limfocitima u mikrookruženju tumora prvi put je opisana 1991. godine. Od tada brojne studije istražuju povezanost između tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) i drugih prognostičkih parametara (25, 26). Primećeno je da je subpopulacija citotoksičnih CD8+ T-limfocita prognostički faktor koji najviše korelira sa povoljnim ishodom bolesti. Visok broj TIL-a je takođe pokazao značajan porast preživljavanja obolelih od karcinoma jajnika, sugerirajući da bi takav antitumorski imunološki odgovor mogao biti ispitan kao jedna od terapijskih strategija (27-29). Dokazana je povezanost TIL-a sačinjenih od CD3+ i CD8+ T-limfocita i dužeg preživljavanja pacijentkinja obolelih od karcinoma jajnika, nezavisno od histološkog tipa, gradusa i stadijuma tumorske bolesti (30). Populacija infiltrirajućih tumorskih limfocita razičita je u donosu na stadijume tumorske bolesti ovarijalnog karcinoma. U uznapredovalim stadijumima FIGO III i IV prisutna je veća zastupljenost regulatornih T-limfocita i MDSC ćelija, u odnosu na niže stadijume bolesti (31).

Brojni su mehanizmi koje tumorske ćelije razvijaju u cilju izbegavanja antitumorskog imunološkog odgovora. Najzastupljeniji mehanizmi uključuju supresiju ekspresiranja tumor specifičnih antigena na površinama tumorskih ćelija, nishodnu regulaciju molekula histokompatibilnosti (MHC), prekomernu ekspresiju antiapoptotskih proteina (bcl-2), povećanje broja imunosupresivnih, regulatornih T-limfocita. Ekspresijom inhibitornih površinskih proteina, kao što su *cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4* (CTLA-4) i *programmed death 1- programmed death ligand* (PD-1/PD-L1) regulatorni mehanizam, aktiviraju se imunosupresivni regulatorni putevi koji vrlo efikasno suprimiraju imunološke odgovore domaćina. Cilj ovakve ekspresije je kamufliranje i izbegavanje imunološke detekcije tumorskih ćelija (32).

1.3. PD-L1/PD-1 imunosupresivni regulatorni mehanizam

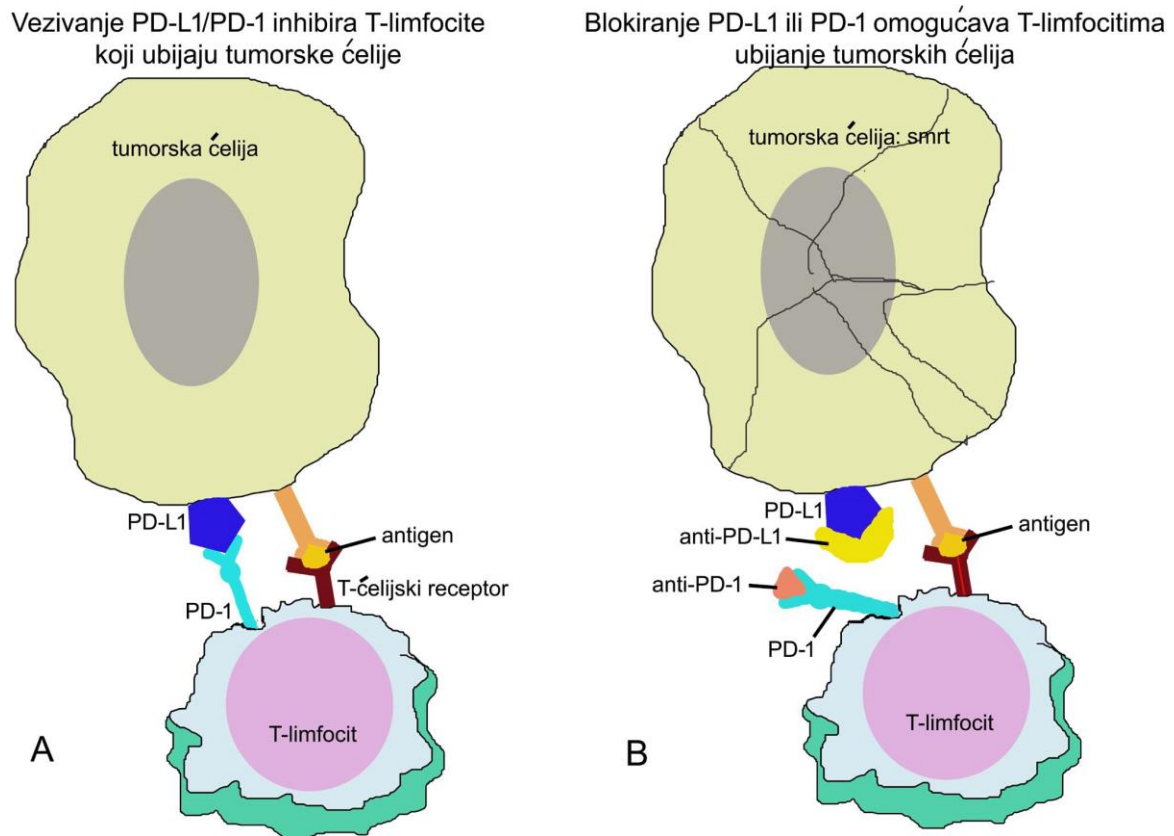
Imunološki „*checkpoint*“ mehanizmi svoju funkciju ostvaruju prilikom vezivanja antigena za receptor T-limfocita. Oni svojom kostimulatornom funkcijom mogu modifikovati uticaj spajanja receptora i antigena u smislu stimulacije ili inhibiranja. Dva za sada najistraženija imunosupresivna „*checkpoint*“ mehanizma su PD-1/PD-L1 i CTLA-4 kontrolni punktovi. CTLA-4/B7 signalni put podrazumeva vezivanje B7 molekula (B7-1, B7-2) sa CTLA-4 molekulom eksprimiranim na površini antigen prezentujućih ćelija i T-limfocita. Ovaj signalni put ima funkciju supresije T-limfocitnog receptora tj. inhibicije imunološkog odgovora. Vezivanjem PD-L1 ili PD-L2 za PD-1 receptor aktiviraju se inhibitorni signali koji suprimiraju aktivnost T-limfocita. Gubitak funkcije efektorskih T-limfocita identifikovano je studijama sa hroničnim virusnim infekcijama kod miševa u kojima je utvrđeno da je sprega PD-L1/PD-1 važna negativna povratna sprega koja osigurava imunološku homeostazu i krucijalna je za ograničavanje antitumorskog imuniteta (33-36).

Površinski ćelijski receptor programirane ćelijske smrti (PD-1) je prvi put otkriven 1992. godine kao regulatorni gen u T ćelijskim hibridomima i na hematološkim progenitornim ćelijama. Predstavlja imunosupresivni, koinhibitorni molekul iz grupe CD28 T-limfocitnih receptora. PD-1 (CD279) je transmembranski protein sačinjen od 288 aminokiselina, sa transmembranskim delom koji je predstavljen imunoglobulinskim (Ig) domenom. Transmembranski deo, udružen sa intracelularnim delom čine aktivni deo ćelijskog receptora koji je povezan sa inhibitornim intracelularnim mehanizmom i regulisan putem fosforilizacije tirozina. Vezivanjem PD-1 receptora za T-limfocitni receptor dolazi do fosforilizacije citoplazmatskog dela tirozina, posledične defosforilizacije RAS proteina i PI3K regulatornog puta (*phosphatidylinositol 3-kinase*), što sve dovodi do inhibicije nishodnih regulatornih signalnih puteva. PD-1 protein se eksprimira na T i B-limfocitima, NK ćelijama, dendritičnim ćelijama i aktiviranim monocitima. PD-1 molekul CD28 pripada grupi receptora koji se eksprimiraju na aktiviranim T-limfocitima. Ima značajnu funkciju u regulaciji centralne i periferne T-limfocitne tolerancije, u cilju izbegavanja autoimunih poremećaja. Takođe utiče na regulaciju diferencijacije memorijskih T-limfocita. PD-1 receptor sačinjava deo inhibitornog receptorskog spoja zajedno sa svojim ligandom PD-L1 proteinom i manje učestalim PD-L2 ligandom (28, 34, 35, 37).

PD-L1 (B7-H1, CD274) receptor je takođe transmembranski protein, sačinjen od 290 aminokiselina. Najveći deo PD-L1 receptora je ekstracelularni u kome se nalazi vezujući domen za PD-1 protein. Mnogi tipovi ćelija mogu eksprimirati PD-L1 ligand, uključujući tumorske ćelije pluća, jajnika, melanoma, debelog creva. Imunološke ćelije nakon stimulacije interferonom gama (IFN- γ) takođe eksprimiraju PD-L1 protein (T-limfociti, B-limfociti, NK ćelije, dendritične ćelije, makrofagi). PD-L1 ligand se takođe uočava na aktiviranim vaskularnim endotelnim ćelijama, mezenhimalnim stem ćelijama, mastocitima izolovanim iz koštane srži. Ekspresija PD-L2 (B7-H2, CD273) je dosta manja u odnosu na PD-L1. PD-L2 se uglavnom eksprimira na dendritičnim ćelijama, makrofagima i mastocitima iz koštane srži (28, 34, 38).

Kontrolni punkt PD-1/PD-L1 ima vrlo bitnu ulogu u očuvanju integriteta imunološkog sistema organizma (**Slika 2**). U tumorskim ćelijama PD-1/PD-L1 regulatorni mehanizam može zaštititi tumor od citotoksičnih T-limfocita narušavajući antitumorski imunitet na dva načina. Prvi je u limfnim nodusima, gde prekomerna ekspresija PD-L1 na TIL-u može sprečiti aktivaciju novih citotoksičnih T-limfocita u limfnim nodusima i

posledično uništenje tumora. Drugi je u mikorokruženju tumora gde ushodna regulacija PD-L1 na dendritičnim ćelijama dovodi do deaktivacije citotoksičnih T-limfocita. U oba slučaja interakcija PD-L1 sa svojim receptorom PD-1 na površini T-limfocita suprimira njihovu funkciju, indukujući T-limfocitnu toleranciju, inhibira proliferaciju T-limfocita, produkciju citokina i pomaže imunološkom neprepoznavanju tumorskih ćelija (39, 40).



Slika 2. Prikaz regulacije PD-1/PD-L1 intercelularnog mehanizma. A. Vezivanje T-limfocita sa tumorskom ćelijom koja eksprimira PD-L1 molekul. B. Blokiranje PD-1/PD-L1 mehanizma terapijskim inhibitorynim antitelima. *Prilagođeno iz: Eno J.(28).*

Tumorske ćelije imaju varijabilnu ekspresiju PD-L1 markera koja je pod uticajem različitih intracelularnih procesa. Konstitutivna ekspresija PD-L1 molekula podrazumeva trajnu, difuznu, izraženu ekspresiju na tumorskim ćelijama. PD-L1 ekspresija na tumorskim ćelijama koja nastaje uticajem interferona tip I i II je indukovana ekspresija koja je načešći tip PD-L1 ekspresije na različitim tipovima karcinoma. Najčešće se detektuje kao fokalna ekspresija, najizraženija u predelu najveće invazivnosti tumora, sa dosta peritumorskih T-limfocita. Različite genetske abnormalnosti u tumorskim ćelijama mogu dovesti do potpunog gubitka PD-L1 ekspresije (41).

1.4. Imunoterapija u ovarijalnom karcinomu

Standardni terapijski protokoli u lečenju pacijentkinja obolelih od ovarijalnog karcinoma zasnivaju se na primeni taksan-platinskih protokola. Uprkos primenjenoj terapiji, pacijentkinje sa uznapredovalim stadijumima bolesti vrlo slabo reaguju na do sada primenjene modalitete lečenja, uz vrlo kratke vremenske intervale preživljavanja nakon terapije. Oko 80% pacijentkinja ulazi u fazu remisije nakon kombinovane primene hirurške i hemioterapije, uz relaps bolesti kod oko 60% pacijentkinja nakon 16-18 meseci (42).

Imunoterapija ima svoje tri forme: aktivnu, pasivnu i imunomodulatornu imunoterapiju. Aktivna imunoterapija zasniva se na stimulanju imunološkog sistema domaćina upotrebom antitumorskih vakcina. Prednosti aktivne imunoterapije su dugotrajnije terapijsko dejstvo i stimulacija imunološke ćelijske memorije. Neefikasna je kod imunosupresivnih pacijenata i često je udružena sa odloženim terapijskim odgovorom. Pasivna imunoterapija sačinjena je od veštački proizvedenih imunoloških faktora čija je funkcija stimulacija antitumorskog imunološkog odgovora. Najčešće u upotrebi su citotoksični T-limfociti, anti-PD-L1 antitelo, citokini. Imunomodulatorna imunoterapija podrazumeva inhibitore imunoloških interćelijskih regulatornih puteva i predstavlja imunoterapiju u užem smislu (43).

Novi modaliteti lečenja usmeravaju se na povratak pravilne regulacije imunoloških odbrambenih mehanizama domaćina. Suština antitumorske imunoterapije je u ciljanom delovanju specifičnih antitela na odgovarajuće receptore prilikom čega se ostvaruje inhibicija poznatih protumorskih signalnih puteva. Za sada najbolje proučeni imunološki „*checkpoint*“ receptori, značajni za primenu imunoterapije su CTLA-4, PD-1 i PD-L1. Imunoterapija zansovana na ovim regulatornim receptorima pokazala je značajnu terapijsku efikasnost u lečenju uznapredovalih karcinoma. CTLA-4 je prvi imunološki regulatorni receptor uključen u istraživanje imunoterapije u lečenju melanoma sa značajnim poboljšanjem preživljavanja pacijenata (44-46). Blokiranjem PD-L1 receptora monoklonskim specifičnim antitelima sprečava se aktivacija PD-1/PD-L1 imunosupresivnog mehanizma što omogućava fiziološkim imunološkim mehanizmima da kontrolišu proliferaciju tumorskih ćelija. Imunološki „*checkpoint*“ inhibitori su nova vrsta lekova koja nije usmerena direktno na tumorske ćelije, već na ligande i receptore na T-limfocitima koji su uključeni u antitumorski odgovor (27).

Identifikacija PD-L1 kao imunomodulatornog receptornog proteina, eksprimiranog u 20%-50% tumorskih ćelija kod različitih tipova karcinoma, dovela je do uvođenja PD-L1 imunoterapije u lečenju onkoloških pacijenata (17). Primena anti-PD-L1 monoklonalnih antitela pokazala je efikasnost kod više vrsta karcinoma: urotelni karcinom mokraćne bešike, nesitnoćelijski karcinom pluća, bubrežni karcinom, melanom, karcinomi glave i vrata. Osnovni mehanizam dejstva je blokiranje vezivanja PD-L1 liganda na tumorskim ćelijama sa PD-1 receptorom eksprimiranim na antitumorskim T limfocitima, čime se sprečava supresija T-limfocita (47). Aktuelna su istraživanja koja se zasnivaju na blokadi PD-1 receptora na T-limfocitima kao i ispitivanje pridruženih regulatornih intracelularnih mehanizama. Pacijenti oboleli od melanoma pokazuju ekspresiju PD-1 receptora na tumor infiltrišućim limfocitima. Blokiranjem ovih PD-1 receptora dolazi do veće proliferacije efektivnih T-limfocita (48, 49).

Nivolumab je humano monoklonsko antitelo koje se vezuje za PD-1 receptor i inhibira njegovu funkciju. Njegova primena je pokazala efikasnost u lečenju pacijentkinja sa

ovarijalnim karcinomom rezistentnih na platinsku hemioterapiju. Pembrolizumab je takođe PD-1 inhibitor i za sada jedino odobreno antitelo koje se koristi kao prva linija terapije i to kod pacijenata obolelih od karcinoma pluća kod kojih je nivo ekspresije veći od 50% tumorskih ćelija (50). Njegova primena je našla ulogu i kod pacijenata sa progresijom bolesti nakon platinskih citostatika, ako je ekspresija PD-L1 markera prisutna u najmanje 1% tumorskih ćelija. Takođe se primenjuje i kod pacijenata sa progresivnim solidnim tumorima bez obzira na poreklo, pacijenata sa detektovanom visokom mikrosatelitskom nestabilnošću gena i poremećenom regulacijom gena popravke DNK (dezoksiribonukleinska kiselina) (43, 50).

Lečenje HGSC jajnika kao najučestalijeg histološkog tipa, pokazuje veliki procenat recidiva i rezistentnosti na standardne platinske hemioterapijske lekove. S obzirom na povoljnije terapijske ishode kod pacijentkinja koje imaju izraženiji limfocitni antitumorski odgovor, imunomodulatorna terapija bi mogla biti efikasno rešenje za poboljšanje prognoze pacijentkinja obolelih od HGSC. Istraživanja pokazuju značajan prognostički uticaj ekspresije PD-L1 i PD-1 markera u karcinomskim ćelijama HGSC koji mogu biti nezavistan prognostički parametar. Primena imunosupresivne terapije kod ovakvih pacijentkinja mogla bi biti dragocena s obzirom na vrlo lošu prognozu bolesti (**Tabela 2**) (27, 51).

Tabela 2. PD-1/PD-L1 inhibitori u lečenju ovarijalnog karcinoma

Ciljano mesto dejstva leka	PD-1	PD-L1
Naziv leka (antitelo)	<p>Nivolumab (Opdivo*)</p> <p>Pembrolizumab (Keytruda*)</p> <p>Pidilizumab</p> <p>AMP-224</p> <p>MEDI-0680</p>	<p>Durvalumab</p> <p>Atezolizumab</p> <p>Avelumab</p> <p>BMS-936559</p>

* Komercijalni naziv leka

PD-1- Programmed death 1, PD-L1- Programmed death ligand 1. *Prilagođeno iz: Zhu X. (25).*

Istraživanja primene inhibitora PD-L1 receptora na miševima pokazala su postojanje neželjenih toksičnih efekata. Kod pojedinih animalnih modela detektovano je prisustvo značajnijih inflamatornih i autoimunih procesa. Pojava pneumonitisa nakon primene Avelumab-a (inhibitora PD-L1 receptora) može se pojaviti kod pacijentkinja sa ovarijalnim karcinomom lečenih na ovaj način. Takođe se mogu javiti dijareja, umor, malaksalost, mučnina, artralgiya, svrab po koži, glavobolja, endokrini i autoimuni poremećaji. Primena imunosupresivne terapije bi trebalo biti strogo kontrolisana i pažljivo indikovana kod pacijenata sa već postojećim autoimunim i sistemskim inflamatornim oboljenjima (52-54).

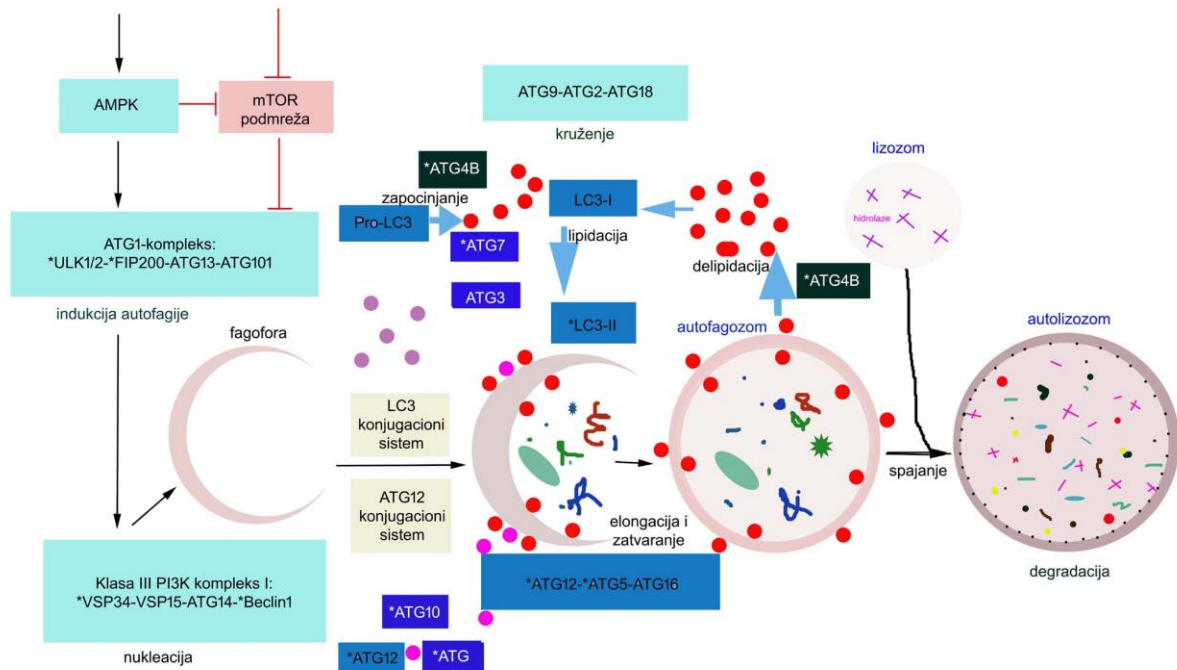
1.5. Autofagija

Autofagija je osnovni ćelijski mehanizam koji učestvuje u održavanju intracelularne homeostaze i pomaže preživljavanje ćelija u uslovima stresa. To je fiziološki proces koji podrazumeva uklanjanje loše sklopljenih proteina, oštećenih organela, i drugih raspadnih produkata, na taj način regulišući rast i razvoj ćelija. Učestvuje u raznim fiziološkim procesima kao što su: diferencijacija ćelija, ćelijsko gladovanje, ćelijski stres, putem regulacije brojnih transkripcionih faktora i signalnih puteva. Autofagija podrazumeva razgradnju citoplazmatskih sastojaka uz pomoć hidrolitičkih enzima lizozoma. Čitav mehanizam autofagije se dešava putem serije dobro poznatih koraka koji podrazumevaju: formiranje autofagozoma, formiranje autolizozoma i degradaciju. Svaki od ovih koraka ima veoma važnu ulogu u regulisanju procesa autofagije. Greška u bilo kom stadijumu procesa utiče na čitav mehanizam (40, 55-57).

Postoje tri glavna tipa autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonima. U procesu makro i mikroautofagije degradacija membrana autofagozoma omogućava spajanje sa lizozomom i razgradnju supstrata, za razliku od šaperonima pomognutom autofagijom koja susprate za razgradnju translocira kroz membranu lizozoma (58). Makroautofagija predstavlja autofagiju u užem smislu prilikom koje se formira fagofora, citoplazmatska struktura sačinjena od dvostruke membrane, unutar koje se nalazi supstrat za razgradnju. Daljim procesima fagofora sazreva, formira se autofagozom čijim spajanjem sa lizozomom nastaje autolizozom. Mikroautofagija podrazumeva invaginaciju i odvajanje dela membrane lizozoma koja ograničava supstrat i razgrađuje ga unutar lizozoma. Prilikom autofagije posredovane šaperonima “*heat shock*” protein HSC70 prepoznaje supstrat za razgradnju koji ispoljava KFERQ molekul. Tako prepoznati supstrati vezuju se za membranu lizozoma i pomoću membranskog glikoproteinskog transportera LAMP2A unose se u lumen lizozoma gde se razgrađuju (59, 60). Pojam selektivne autofagije podrazumeva razgradnju specifičnih ćelijskih struktura kao što su mitohondrije (mitoautofagija), jedro (nukleofagija), peroksizomi (peksifagija) ili ciljanih bakterijskih patogena (ksenofagija). Mitoautofagija se dešava u procesu formiranja eritrocita pri kome se eliminiše veći broj mitohondrija iz njihovih prekursora, retikulocita (61-65).

1.5.1. Faze i mehanizam procesa autofagije

Autofagija je fino regulisan intracelularni fiziološki proces koji uključuje više od 30 povezanih proteina (**Slika 3**). Oni učestvuju u definisanim fazama mehanizma autofagije: inicijacija, promocija (elongacija), formiranje autofagozoma sa dvostrukom membranom, spajanje autofagozoma i lizozoma formirajući autolizozom gde se odvijaju katabolički procesi i reciklaža obnovljivih intracelularnih molekula (66, 67).



Slika 3. Mehanizam procesa autofagije sa najznačajnijim regulatornim proteinima.
Prilagođeno iz: Bortnik S. (66).

Najpre dolazi do formiranja fagofore, izolacione membrane (faza inicijacije), u čijem stvaranju učestvuju membrane endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija. Tokom faze elongacije i preostale organele doniraju delove svojih membrana, pri čemu se fagofora izdužuje. Zatvaranjem slobodnih krajeva fagofore formira se autofagozom što po nekim autorima označava fazu maturacije (68-71).

Na molekularnom nivou nalazi se čitav spektar ukrštenih i međusobno zavisnih reakcija čijom pravilnom regulacijom dolazi do odvijanja prethodno opisanih faza autofagije. Vrlo značajan regulatorni protein autofagije je mTOR protein kinaza (*mammalian target of rapamycin*) koji predstavlja centralni regulatorni molekul autofagije. Utvrđeni su malobrojni slučajevi procesa autofagije koji ne uključuju ovaj molekul. Proces inicijacije počinje aktivacijom serin-treonin kinaza ULK1 i ULK2 (*Unc-51-like kinases 1 i 2*) koje primaju signale od mTOR i AMPK regulatornih proteina (*AMP-activated protein kinase*). Formiranje autofagozoma regulisano je molekulima ATG13, ATG101 i FIP200 koji formiraju koplekse sa ULK1/2 proteinima. Aktivacija ULK1 kinaze bitna je za uključivanje PIK3C3/VPS34 molekula (*phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*) unutar fagofore, prekursora autofagozoma. Udruženo sa VPS15 molekulom (*PI3K regulatory subunit 4*), ATG14 i Beclin1 proteinom, VPS34 molekul formira PI3K kompleks I, klasa III, koji produkuje PI(3)P (*phosphatidylinositol 3-phosphate*) na mestima nukleacije fagofore, uključen u proces elongacije. Takođe se aktiviraju sistemi ubikvitinu slične konjugacije koji obezbeđuju konjugaciju proteina ATG12 sa ATG5 i ATG16L1 i kasnije ATG8/ MAP1LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) tj. LC3 proteina sa fosfatidiletanolaminom, uz sadejstvo brojnih regulatornih enzima, pre svega ATG4B cistein peptidaze. LC3 molekul je u interakciji sa p62 regulatornim proteinom, koji pomaže u završnom formiranju autofagozoma. LC3 molekul takođe učestvuje u procesu elongacije. Nakon potpunog formiranja membrane autofagozoma dolazi do njegove fuzije sa lizozomom i stvaranja

autolizozoma unutar koga su brojni katabolički hidrolitički enzimi koji proizvode katabolizma odlažu u citoplazmu na raspolaganje za dalje korišćenje. Većina spomentuih proteina i molekula koji regulišu formiranje autolizozoma, gube se prilikom nastanka autofagozoma tj. dolazi do gubitka njihove ekspresije. LC3 molekul je vrlo postojan i ostaje eksprimiran tokom čitavog procesa autofagije. Kao takav, vrlo često je jedan od glavnih markera koji se prati prilikom definisanja procesa autofagije (66, 72, 73-80). Pored ATG5/7 zavisnog mehanizma autofagije, 2009. godine je otkriven i ATG5/7 nezavisan mehanizam, tkzv. alternativna autofagija prilikom koje molekularni kompleksi i proteini ULK1, Beclin1 i PI3K takođe ostvaruju svoje uobičajene funkcije. Razlika u odnosu na konvencionalnu autofagiju je zamena lipidacije LC3 molekula aktivnostima Rab9 molekula koji kontroliše proces elongacije fagofore (60).

1.5.2. Autofagija i tumor

Autofagija je vrlo bitna u nastanku i razvoju neoplastičnih procesa kao i u reagovanju tumora na razne oblike antitumorske terapije. Poznato je da autofagija ima dvojaku ulogu u tumorogenezi. U ranoj tumorogenezi autofagija ima tumor supresorsku ulogu tako što promovise genomsku stabilnost i inhibira inflamaciju. Potom, kako tumor raste, kancerske ćelije autofagiju koriste da prežive nedostatak nutrijenata i kiseonika, posebno u centralnim delovima tumora koji su obično lošije vaskularizovani i na taj način omogućavaju tumorsku progresiju (40, 81, 82). S obzirom na ulogu autofagije u tumorogenezi putem koje tumorske ćelije pokušavaju da opstanu aktiviranjem svojih intracelularnih kataboličkih procesa, zaključuje se da je primena inhibitora autofagije najefikasnija u slučajevima kada su mehanizmi preživljavanja tumorskih ćelija najaktivniji (40).

Dokaz o tumor supresorskoj funkciji autofagije pokazuju antionkogene funkcije pojedinih ATG proteina, među kojima je i Beclin1. Inaktivacija gena Beclin1 dovodi do stimulacije tumorogeneze, dok je njegova prekomerna ekspresija udružena sa inhibiranjem nastanka tumora dojke u animalnim modelima. Tumor supresorska funkcija Beclin1 proteina potvrđena je detekcijom delecije alela njegovog gena kod karcinoma jajnika, dojke, prostate (83-85). Takođe je pokazano da aktivacija tumor supresorskog gena ARH1 (*aplasia Ras homolog member 1*) dovodi do ćelijske smrti pokretanjem procesa autofagije u kultivisanim humanim ćelijama ovarijalnog karcinoma. Različiti faktori iz tumorskog mikrookruženja utiču na ekspresiju ARH1 gena tj. aktivaciju autofagije. Značajna uloga mikrookruženja je aktivacija trenutno inaktivnih karcinotskih ćelija stimulisanjem procesa autofagije pri čemu karcinotske ćelije ponovo započinju svoju proliferaciju i stvaraju karcinotsku bolest. Studije pokazuju smanjenu ekspresiju ARH1 gena u 60% primarnih karcinoma jajnika sa takođe kraćim vremenom preživljavanja nakon hemioterapije (86).

Pojedini protoonkogeni kao što su mutacije RAS gena mogu pokrenuti proces autofagije u karcinotskim ćelijama čak i u stanju sa dovoljno ćelijskih nutrijenata. Autofagija je značajan faktor u proliferaciji tumora sa RAS mutacijama (83-85). Tumor promoterski onkogen MARCH5 (*membrane-associated RING-CH*) u karcinotskim ćelijama jajnika ima značajnu funkciju u regulaciji autofagije, migracije i invazivnosti karcinotskih ćelija. MARCH5 protein kontroliše sazrevanje i funkciju mitohondrija. Takođe poseduje imunološku regulatornu funkciju, kontroliše proteinski sastav ćelije i transmembranski transport. MARCH5 protein stimuliše proces autofagije u karcinotskim ćelijama jajnika regulacijom TGFB1-SMAD2/3 signalnog puta. Istraživanja pokazuju potencijalnu upotrebu

MARCH5 markera u ranoj detekciji ovarijalnih karcinoma s obzirom na ushodnu regulaciju njegove ekspresije u tumorskom tkivu. Ekspresija MARCH5 gena je u pozitivnoj korelaciji sa histološkim gradusom i stadijumom tumorske bolesti (87).

Proces autofagije u karcinomskim ćelijama je pod uticajem epigenetskih faktora kao što su metilacija i histonska acetilacija DNK. Ekspresija ARH1 regulatornog gena autofagije u ovarijalnim karcinomskim ćelijama suprimirana je zahvaljujući hipermetilaciji njegovog promotora. Aktuelno se istražuje efekat inhibiranja histonske acetilacije DNK Valproinskom kiselinom u lečenju ovarijalnog karcinoma. Inhibiranjem histonske acetilacije dolazi do sprečavanja spajanja autofagozoma i lizozoma i posledično suprimiranja procesa autofagije (88).

Starenje je neizbežan faktor koji je povezan sa većom učestalošću karcinoma. Ćelijsko starenje se razlikuje među tkivima i značajno je povezano sa vrstom i funkcijom matičnih ćelija. Autofagija reguliše metabolizam i funkciju neizmenjenih matičnih ćelija kao i matičnih ćelija karcinoma. Karcinomske matične ćelije su najodgovornije za nastanak metastaza, povratak bolesti i razvoj rezistencije na hemioterapiju. Autofagija je intracelularni proces koji omogućava ove funkcije matičnih ćelija. Pokazana je povezanost ekspresije CD44 markera karcinomskih matičnih ćelija sa većom invazivnošću karcinoma i brojnijim metastazama. Proces autofagije je značajan da zaštiti matične karcinomske ćelije od metaboličkog stresa i omogući njihovo preživljavanje u uslovima nedostatka kiseonika i nutrijenata. Nakon hemioterapije preživele karcinomske matične ćelije aktiviraju proces autofagije i ponovo započinju svoju proliferaciju i diferencijaciju što dovodi do rekurencije karcinomske bolesti. Pretpostavka je da bi se inhibiranjem autofagije u karcinomskim matičnim ćelijama poboljšali rezultati lečenja kod uznapredovalih karcinoma i kod relapsa tumora (79, 89, 90).

Autofagija ima značajan uticaj na formiranje tumorskog mikrookruženja u kome pokazuje kontradiktornu funkciju u tumorogenezi, predominantno protumorsku. U tumorskom mikrookruženju autofagija utiče na diferencijaciju i stvaranje tumor udruženih makrofaga (TAM) i fibroblasta (CAFs- *Cancer Associated Fibroblasts*) koji ostvaruju imunosupresivni uticaj, pospešuju tumorski rast, invazivnost i rezistenciju na hemioterapiju. CAF procesom autofagije razgrađuju proteine, dovode do stvaranja aminokiselina koje tumorske ćelije koriste za svoje metaboličke potrebe. Autofagija takođe stimuliše stvaranje krvnih sudova u tumorskom mikrookruženju u cilju adekvatnijeg dopremanja nutrijenata karcinomskim ćelijama. Promovišu se procesi obnavljanja esencijalnih aminokiselina u tumorskom mikrookruženju, bitnih za tumorski rast. Takvo mikrookruženje pomaže tumorskim ćelijama da prevaziđu metabolički stres i održe homeostazu (83, 85, 91).

Tumorsko mikrookruženje indukuje hipoksiju, inflamaciju i sekreciju različitih citokina. Istraživanja pokazuju da 50% tumora mogu opstati u uslovima hipoksije. Tumorska hipoksija ima različite uticaje na autofagiju zavisno od trajanja i intenziteta hipoksičnog stanja. U slučaju srednje i dugotrajne hipoksije produkuje se HIF-1 α (*hypoxia-induced factor-1 alpha*) i aktivira PKC-JNK mehanizam regulacije autofagije u tumorskim ćelijama. Molekul JNK utiče na odvajanje Beclin1 proteina vezanog za Bcl-2 molekul i omogućava mu učešće u formiranju autofagozoma tj. stimuliše proces autofagije. Hipoksija udružena sa nedostatkom nutrijenata u tumorskim ćelijama kao što su glukoza ili esencijalne aminokiseline dovodi do HIF-1 α nezavisne stimulacije autofagije, utičući na aktivaciju AMPK kinaze i inhibiciju mTOR mehanizma (59, 92).

Autofagija bitno utiče na metabolizam tumorskih ćelija u različitim tipovima karcinoma. Mnogi tipovi tumora pokazuju povišen bazalni nivo procesa autofagije. U cilju zadovoljenja svojih potreba karcinomske ćelije regulišu metabolizam pri čemu dodatno aktiviraju neophodne anaboličke procese s obzirom na ubrzanu proliferaciju. Lizozomi imaju značajnu funkciju u regulaciji metaboličkih procesa u karcinomskim ćelijama (61, 84, 85, 93).

1.5.3. Terapija vezana za proces autofagije

Autofagija je intracelularni proces uključen u patogenezu nastanka različitih karcinoma, neurodegenerativnih oboljenja, infekcija, inflamatornih procesa, dijabetesa, gojaznosti, kardiovaskularnih i mišićnih poremećaja. Mnoge studije ispituju efekte modulacije autofagije u svrhu pronalaženja ciljane terapije. Proces autofagije se može terapijski regulisati u različitim pravcima, od stimulacije do inhibiranja mehanizma, uključivanjem brojnih faktora na koje se može terapijski uticati. Inhibitori autofagije (**Tabela 3**) podrazumevaju PI3K inhibitore, Cycloheximid, inhibitore Vacuolar-type H(+)-ATP-aze, inhibitore kiselih proteaza, lekove koji vrše alkalizaciju sadržaja lizozoma. Grupi takođe pripadaju Hlorokin i Hidroksihlorokin (inhibitori lizozoma), azitromicin (makrolidni antibiotici) koji blokira zakišeljavanje sadržaja lizozoma. Hlorokin i hidroksihlorokin pored inhibicije autofagije ostvaruju i druga terapijska dejstva kao što su: inhibiranje antitumorskog imunološkog odgovora, regulacija permeabilnosti lizosomalne membrane koja je povezana sa apoptozom (56, 60, 64, 94, 95).

Tabela 3. Inhibitori autofagije i njihova ciljana mesta dejstva

Naziv leka	
Inhibitori autofagije u ranim stadijumima bolesti	
3- methyladenine	klasa III PI3K
Wortmanin	klasa III PI3K
LY294002	klasa III PI3K
Inhibitori autofagije u kasnim stadijumima bolesti	
Chloroquine, hydroxychloroquine	aktivnost lizozoma
Bafilomycin	aktivnost lizozoma
Monesin	aktivnost lizozoma

PI3K- Phosphatidylinositol 3- kinase. *Prilagođeno iz: Robainas M. (40).*

Značajni molekuli za dejstvo modulatora autofagije su AMPK kinaza i mTOR mehanizam kao jedni od ključnih molekula procesa autofagije. AMPK je ćelijski energetski senzor koji se aktivira za vreme stresa ili usled remećenja metabolizma glukoze. Aktivacija AMPK kinaze pokreće proces autofagije početnom fosforilacijom ULK1 molekula i TSC1/TSC2 kompleksa koji lančano pokreću čitav dalji proces. Molekul mTOR najviše reaguje na promene ćelijske oksigenacije i učestvuje u regulaciji rasta i proliferacije ćelija (60). Supresija funkcije mTOR molekula inhibitorima NVP-BEZ235, RAD001, AZD8055,

usporava tumorski rast, redukuje ćelijsko preživljavanje i stimuliše proces autofagije. Dejstvo navedenih inhibitora mTOR mehanizma zavisi od doze i od prisustva antiapoptotskih proteina koji omogućavaju preživljavanje karcinomskih ćelija. Rapamicin je inhibitor mTOR signalnog puta koji na animalnim modelima redukuje 90% prisustva tumora pluća. Takođe pokazuje imunosupresivne funkcije inhibiranjem sazrevanja dendritičnih ćelija, supresijom proliferacije i diferencijacije T-limfocita, privlačenjem Treg-limfocita (59, 83).

Studije pokazuju uticaj autofagije u nastanku rezistencije na hemioterapiju pospešujući preživljavanje karcinomskih ćelija. Hemioterapijski lekovi koji oštećuju DNK karcinomskih ćelija (Temozolomid, Cisplatina) ili inhibiraju sintezu tumorske DNK (5-fluorouracil, Gemcitabin), inhibiraju tumorski rast i stimulišu proces autofagije. Lekovi koji utiču na blokiranje mutiranih receptora i signalnih molekula kao što su: Erlotinib, Gefitinib (EGFR mutacija), Imatinib (aktivacija tirozin kinaze), Vemurafenib, Dabrafenib (BRAF mutacija), Trastuzumab (HER2 amplifikacija), takođe aktiviraju procese autofagije u cilju preživljavanja karcinomskih ćelija. S obzirom na to istražuje se efikasnost udružene primene navedenih lekova i inhibitora stvaranja autolizozoma (Hlorokin, Hidroksihlorokin, Bafilomycin A, 3-methyladenine) koji u *in vitro* uslovima pokazuju značajne terapijske rezultate (59, 83). Inhibiranje autofagije Hlorokinom dovodi do pojave veće senzitivnosti na platinsku hemioterapiju u lečenju pacijentkinja obolelih od svetloćelijskog karcinoma jajnika (96). Udruženom primenom inhibitora autofagije i hemioterapije pokazani su i određeni nedostaci ukazujući na potrebu pronalaska specifičnijih lekova koji će ciljano delovati na jasnije definisane molekule i receptore u mehanizmu inhibicije autofagije. Pored detekcije specifičnih i ključnih molekula regulacije procesa autofagije od velikog je značaja ispitati prirodu i strukturu tumorskih ćelija koje učestvuju u ovim procesima. Pretpostavlja se da različiti tipovi tumora, u različitim organima, imaju drugačiju ekspresiju proteina sa značajnom funkcijom u regulaciji autofagije. U zavisnosti od vrste tumora i stadijuma njegove uznapredovalosti inhibiranje ili stimulacija procesa autofagije mogu različito doprineti tumorogenezi (60, 66, 97-99).

Savremena terapijska rešenja istražuju primenu ciljanih niskomolekularnih inhibitora regulatornih proteina autofagije. Ispituju se funkcije ATP kompetitivnih inhibitora ULK1 kinaze koja je zadužena za pokretanje formiranja autofagozoma. FAK (*Focal Adhesion Kinase*) inhibitori takođe mogu suprimirati funkciju ULK1 kinaze. Spautin-1 inhibira ubikvitin proteaze USP10 i USP13 čije su funkcije odvajanje Beclin1 molekula od ubikvitina. Na taj način dolazi do promocije razgradnje Beclin1/Vsp34 kompleksa i inhibiranja autofagije. Vps34 inhibitor SAR405 suprimira transport vezikula, autofagiju i funkcije lizozoma, ostvarujući antiproliferativni i antitumorski uticaj. Atg4B inhibitor takođe suprimira autofagiju i promovise smrt tumorskih ćelija. HlorokinLys01 je dimer, deset puta potentniji inhibitor autofagije u odnosu na Hidroksihlorokin. Lys05 je modifikovani inhibitor koji poseduje izraženiji efekat akumulacije aktivne supstance, snižava kiselost unutar lizozoma, dovodeći do značajnijeg inhibiranja autofagije i tumorskog rasta. Dalje otkrivanje značaja najsitnijih regulatornih proteina autofagije i ciljano terapijsko dejstvo u cilju regulacije njihovih funkcija doprineće razvitku efikasnije antitumorske terapije (85, 100).

1.5.4. Značajni markeri u procesu autofagije

Istraživanja savremenih terapijskih rešenja vezanih za proces autofagije odnose se na molekule značajne u fazama autofagije na koje se ciljanim delovanjem autofagija može regulisati. Najčešće ispitivani terapijski markeri vezani za regulaciju mehanizma autofagije su: LC3 molekul sa svojom subjedinicom B i p62 protein koji definišu stepen aktivnosti autofagnog mehanizma, mogu pokazati efekte inhibitora lizozoma i nivo autofagije u tumoru. Takođe često primenjivani markeri su: Beclin1, ULK1, ATG4, ATG7 i VPS34 (66). Prva studija koja je ispitivala povezanost između autofagije i tumorogeneze rađena 1990. godine, pokazala je odsustvo alela tumor supresorskog gena koji kodira protein Beclin1 zadužen za proces nukleacije autofagozoma u oko 50% slučajeva ovarijalnih karcinoma (60).

Protein p62 je primarno definisan kao medijator NF- κ B signalnog puta uključenog u različite krucijalne intracelularne procese kao što su regulacija oksidativnog stresa i ćelijskog metabolizma. S obzirom da dolazi do razgradnje p62 proteina prilikom procesa autofagije, smatra se da je p62 marker dobar pokazatelj dinamike autofagnog mehanizma. Inhibiranjem autofagije dolazi do nagomilavanja p62 proteina detektovanog Western blot metodom. Na taj način nam ekspresija p62 markera može biti pouzdan pokazatelj nivoa inhibicije autofagije sa kojom je u pozitivnoj korelaciji. Određena opreznost postoji kod tumačenja ekspresije p62 proteina koji je pod uticajem posttranskripcijskih i posttranslacionih ćelijskih modifikacija. Bez obzira na ove nedostatke, istraživanja pokazuju dovoljnu pouzdanost prilikom tumačenja rezultata ekspresije p62 markera kod velikog broja za sada ispitivanih karcinoma (66, 101, 102).

LC3 protein sa svojom dominantnom B subjedinicom (LC3B), ima svoj citoplazmatski (LC3B-I) i membranozni domen (LC3B-II tj. LC3B „puncta”). Primena inhibitora lizozoma dovodi do akumulacije LC3B-II proteina zahvaljujući blokadi fuzije autofagozoma i lizozoma. Na taj način dolazi do inhibicije razgradnje LC3B markera koji postaje pouzdan pokazatelj procesa autofagije u različitim tipovima karcinomskih ćelija. Proteini p62 i LC3 se razgrađuju prilikom aktivacije procesa autofagije. Dinamika takve razgradnje može ukazivati na stanje autofagije u ispitivanim tumorskim ćelijama (66, 101, 103).

Beclin1 udružen sa VPS34 molekulom predstavlja značajan regulatorni protein mehanizma autofagije. On se izdvaja svojom tumor supresornom funkcijom zbog čega je njegova ekspresija očekivano heterogenija u odnosu na druga dva markera (66).

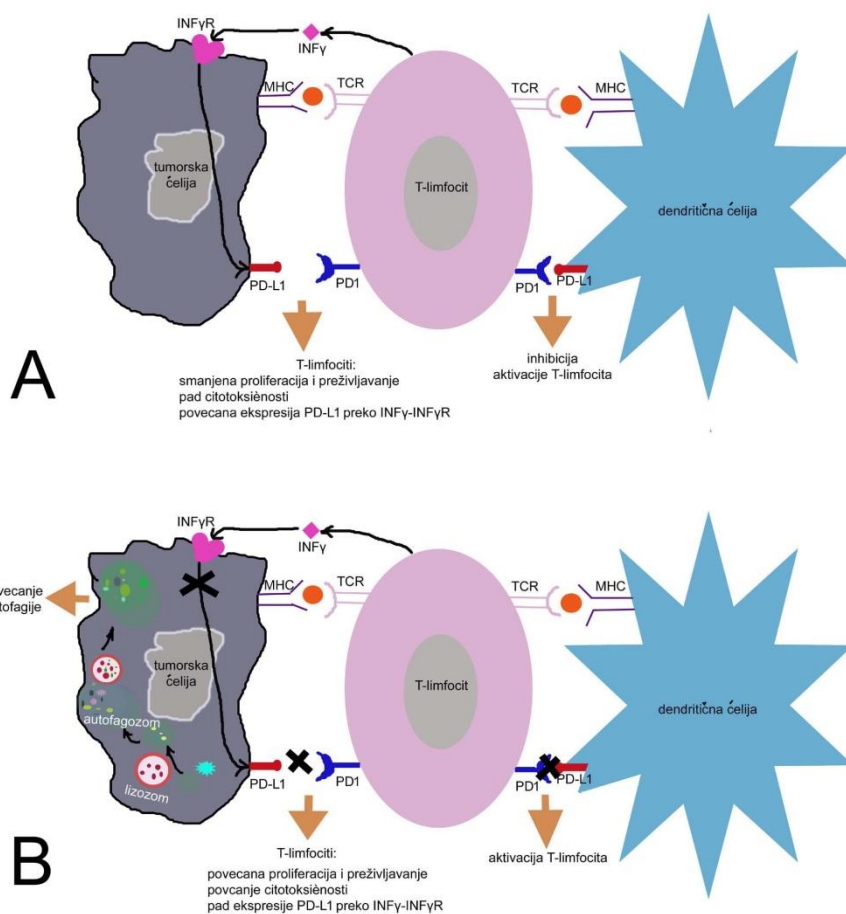
Imunohistohemijska analiza ATG regulatornih proteina procesa autofagije pokazala je prognostički značaj mnogih markera u tkivu različitih karcinoma. Istraživanja imunohistohemijske ekspresije LC3 i p62 markera pokazuju tačkasto „dot like” citoplazmatsko prebojavanje u različitim karcinomskim ćelijama. Pojedine tumorske ćelije mogu ispoljavati udruženu citoplazmatsku i nuklearnu pozitivnost. Takođe su poznate studije koje detektuju difuznu citoplazmatsku ekspresiju LC3 i p62 markera unutar tumorskih ćelija (64, 101). Tumačenja ovako varijabilnih obrazaca ekspresije su različita. Najveći broj istraživača podržavaju tačkasto citoplazmatsku ekspresiju markera kao najverodostojniji pokazatelj procesa autofagije. S obzirom da se LC3 protein eksprimira na membrani autofagozoma, logična je njegova „dot like” intracitoplazmatska imunohistohemijska ekspresija koja zapravo označava formirane autofagozome. Ekspresija LC3 markera je postojana i u kasnijim fazama autofagije kada se autofagozom ne uočava. Neka tkiva LC3

protein ispoljavaju i u drugim intracelularnim strukturama. Hepatociti i kardiomiociti animalnih modela u uslovima gladovanja LC3 marker ekspimiraju u autofagozomima kao i u masnim vakuolama unutar ćelije, što se imunohistohemijski detektuje u vidu prebojenih citoplazmatskih granula (104, 105). Da bi se pokrenuo proces autofagije Beclin1 se mora odvojiti od Bcl-2 molekula i spojiti sa Vps34 molekulom, što se imunohistohemijski pokazuje kao tačkasto citoplazmatsko prebojavanje. Osim tačkaste „dot like” reakcije, Beclin1 antitelo može ispoljiti difuznu, citoplazmatsku ekspresiju. Pojedine studije pokazuju mogućnost nuklearne pozitivnosti Beclin1 markera. Varijabilnost u ekspresiji markera autofagije sugeriše upotrebu udruženih markera iste ili slične funkcije u cilju zadovoljavajuće validnosti dobijenih rezultata (104).

1.6. Značaj udruženih mehanizama imunosupresije i autofagije

Dokazano je da PD-1/PD-L1 signalni put ima vrlo bitnu ulogu u regulisanju intraćelijskih funkcija tumorskih ćelija i njihovog preživljavanja. Autofagija je jedna od tih funkcija koja je pod kontrolom PD-L1 receptora (40, 106, 107). Povezanost između autofagije i imunološkog odgovora u tumorskim ćelijama još uvek nije dovoljno proučena (**Slika 4**).

Do sada je publikovano nekoliko radova koji opisuju pomenutu povezanost, rađeni na kulturi humanih ćelija ovarijalnog karcinoma i na melanomskim ćelijama miševa. Pokazano je da su humane ćelije ovarijalnog karcinoma sa izraženom ekspresijom PD-L1 markera senzitivnije na inhibitore autofagije u poređenju sa ćelijama koje pokazuju slabiju PD-L1 ekspresiju. Melanomske ćelije miševa koje ekspimiraju PD-L1 receptor nisu pokazale veću osetljivost na inhibitore autofagije u odnosu na kontrolnu grupu. Takvi rezultati ukazuju da je ekspresija i regulacija PD-1/PD-L1 signalnog puta i povezanost sa mehanizmom autofagije vrlo heterogena u različitim ćelijskim populacijama (40, 106, 108, 109).



Slika 4. Međusobna povezanost PD-1/PD-L1 intercelularnog mehanizma i procesa autofagije. Prilagođeno iz: Robainas M. (40).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Analiza ekspresije PD-L1 i markera autofagije (p62, LC3 i Beclin1) i njihova povezanost sa različitim histološkim tipovima epitelnih tumora jajnika (serozni, mucinozni, endometrioidni).
2. 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.

3. MATERIJALI I METODE

Studija je dizajnirana kao studija preseka obuhvatajući pacijentkinje operisane zbog epitelnih tumora jajnika u periodu od 1. januara 2017. godine do 31. decembra 2019. godine, u Klinici za ginekologiju i akušerstvo, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu. Na osnovu dosadašnje literature (110) ekspresija PD-L1 se kreće od 55% u citoplazmi, preko 27% u membrani do svega 16% i u citoplazmi i u membrani svih imunopozitivnih tumorskih ćelija. Uzimajući ove podatke u obzir, a za odabranu grešku prvog tipa alfa 0,01 i preciznost ocene $E=0,1$, proračunata veličina uzorka na osnovu formule $n=z^2*p*(1-p)/E^2$ je 164,1 tj. 164 uzorka (pacijentkinja) kojima je dijagnostikovao epitelni tumor jajnika, uključujući maligno i „borderline“ biološko ponašanje tumora, u svim stadijumima tumorske bolesti po FIGO patološkoj klasifikaciji. Parametri koji su analizirani su: starost pacijentkinje, menopauzni status, maksimalni promer i lateralnost tumora, histološki tip tumora, stepen histološke diferencijacije tumora, prisustvo limfovaskularne tumorske invazije, intratumorska i peritumorska limfocitna infiltracija, prisustvo nekroze. Kontrolna grupa su 164 pacijentkinje kojima su dijagnostikovani benigni epitelni tumori jajnika.

Kriterijumi za isključivanje iz studije:

- tumori jajnika koji nisu primarni ovarijalni tumori,
- tumori jajnika koji nisu epitelnog porekla,
- pacijentkinje koje su imale druge malignitete, kao i pridružene tumore koji su patogenetski povezani sa ispitivanim tumorima jajnika,
- pacijentkinje mlađe od 18 godina.

3.1. Uzorkovanje i standardna histološka obrada tkiva

Za analizu su izabrani reprezentativni kalupi tumorskog tkiva koji sadrže centralne, vitalne i periferne delove tumora sa najizraženijom okolnom limfocitnom reakcijom, uzimani tokom standardne procedure uzorkovanja tkiva u Službi za patologiju i medicinsku citologiju, Ginekološko akušerske klinike, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Uzorci kontrolne grupe su delovi benignih tumora sa očuvanim epitelom jasne histološke diferencijacije.

3.2. Formiranje tkivnog mikroniza (*tissue microarray* - TMA)

Mikroskopskim pregledom definisani su najreprezentativniji i najhomogeniji delovi tumorskog tkiva sa najmanje nekroze i krvarenja. Primenom metode *tissue microarray* (TMA) iz svakog parafinskog kalupa upotrebom 3mm punkcione igle uziman je po jedan cilindar tkiva za BOT i APT tumore i po dva cilindra tkiva za OK (**Slika 5**). U OK grupi prvi cilindar je predstavljao vitalne, centralne delove karcinoma, dok su periferni delovi karcinoma sa najizraženijom peritumorskom limfocitnom reakcijom uzimani u drugom cilindru. Cilindri su premeštani u novi, recipijentni parafinski kalup (TMA kalup), gde je formirana serija od po 28 tkivnih cilindara (111). Za unutrašnju kontrolu imunohistohemijske analize i orijentaciju kalupa korišćeno je tkivo placente i limfnog nodusa iz kojih je uzorkovan po jedan tkivni cilindar pozicioniran u prvom redu kalupa (112).



Slika 5. Formirani tkivni mikronizovi epitelnih ovarijalnih tumora

3.3. Metode imunohistohemijske analize

Za formiranje TMA upotrebljeni su tkivni uzorci tumora jajnika fiksirani u 4% pufersanom neutralnom formalinu, dehidrisani, prosvetljeni i prožeti parafinom u aparatu za automatsku fiksaciju tkivnih uzoraka i ukalupljeni u parafinske kalupe. TMA parafinski kalupi su sečeni na mikrotomu na rezove debljine 4 μ . Imunohistohemijska analiza antitelima PD-L1, p62, LC3 i Beclin1 rađena je u Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu na aparatu Autostainer Link 48, Agilent, Danska. Demaskiranje epitopa za PD-L1 i LC3B marker urađeno je u EnVision FLEX rastvoru za demaskiranje epitopa pH 6.1, K8005, Agilent, a za p62 i Beclin1 u EnVision FLEX rastvoru za demaskiranje epitopa pH 9.0, K8004, Agilent. Za imunohistohemijsku analizu korišćen je EnVision FLEX sistem za vizualizaciju K8023, Agilent. Kao primarna antitela korišćena su: monoklonsko anti humano PD-L1 antitelo (klon 22C3), M3653, Agilent u razblaženju 1:30, poliklonsko zečije anti humano p62 antitelo, ab 155686, Abcam u razblaženju 1:500, monoklonsko rekombinantno zečije anti humano Beclin1 antitelo (klon EPR20473), Abcam u razblaženju 1:50 i poliklonsko zečije anti humano LC3B antitelo, ab48394, Abcam u razblaženju 1:200. Ispitivanje je vršeno na uzorcima tumora jajnika (iz centralnih i perifernih delova uzorkovanog tumora) i uzorcima jajnika iz kontrolne grupe. Imunohistohemijsko bojenje analizirano je utvrđivanjem broja pozitivno obeleženih tumorskih ćelija procentualno određenih u odnosu na ukupan broj tumorskih ćelija na vidnom polju uveličanja x400.

3.3.1. Evaluacija ekspresije analiziranih markera

Ekspresija PD-L1 je vrlo heterogena u različitim tumorskim tkivima. S obzirom da postoje četiri aktuelna klona ovog antitela, veliki je problem stvaranja uniformnog tumačenja ekspresije i formiranja validnih graničnih vrednosti. Najčešće korišćen klon je 22C3 koji se koristi i u ovom istraživanju (113). Tumorske ćelije obično pokazuju membransko bojenje na PD-L1 antitelo, sa varijabilnom ekspresijom u citoplazmi i jedru (110). Smatra se da samo membranska pozitivnost korelira sa dobrim terapijskim odgovorom na primenu PD-L1 inhibitora. Citoplazmatska i ponekad nuklearna pozitivnost su najverovatnije produkt nakupljanja PD-L1 *splice* varijanti koje nisu efektivno lokalizovane na membrani (38, 110, 112). Ekspresija markera p62, LC3, Beclin1 određivana je na isti način kao kod PD-L1 antitela. Kao pozitivna ćelijska reakcija smatra se bilo koje delimično ili kompletno membransko PD-L1 bojenje najmanje jedne vitalne tumorske ćelije tj. citoplazmatsko bojenje p62, LC3 i Beclin1 antitelima (114, 115).

Definisana su četiri stepena imunoekspresije s obzirom na procenat imunopozitivnih tumorskih ćelija od ukupnog broja tumorskih ćelija i to: negativna (0) bez pozitivnih ćelija ili sa pojedinačnim pozitivnim ćelijama (<1%); slaba (1+) ekspresija sa manje od 10% pozitivnih ćelija; umerena (2+) ekspresija sa 10-50% pozitivnih ćelija i jaka (3+) ekspresija sa više od 50% ekspresije. Kao tumori sa visokim stepenom ekspresije smatrani su tumori sa umerenom i jakom imunopozitivnošću (112, 113).

3.4. Statistička analiza

Statistička analiza je rađena korišćenjem softverskog paketa Statistical Package for Social Sciences 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Analiza je obuhvatala deskriptivne statističke metode koje podrazumevaju primenu aritmetičke sredine i standardne devijacije ($\bar{x} \pm sd$) za numeričke podatke sa normalnom raspodelom ili medijane i opsega vrednosti (med (min – max)) za numeričke podatke koji odstupaju od normalne raspodele. Poređenje izmerenih parametara između formiranih grupa i podgrupa vršeno je sledećim testovima: za numeričke podatke sa normalnom raspodelom t-testom, za numeričke bez normalne raspodele ili ordinalne Man-Vitnijevim (*Mann-Whitney*) testom, a za testiranje razlike u učestalosti javljanja različitih pojava χ^2 testom ili njegovim pandanom Fišerovim (*Fisher*) testom tačne verovatnoće, ukoliko numerička ograničenja za predhodno navedeni test nisu zadovoljena. Analiza opštih demografskih, kliničkih i patohistoloških parametara pacijentkinja je vršena primenom testova One-Way ANOVA sa Tuckey posthoc testiranjem, χ^2 testom ili njegovim pandanom Fišerovim testom tačne verovatnoće. Primenom χ^2 testa vršena je analiza PD-L1 ekspresije između osnovnih studijskih grupa pacijentkinja; analiza PD-L1 ekspresije u odnosu na ispitivane parametre; poređenje centralnih i invazivnih delova ovarijalnih karcinoma u odnosu na PD-L1, p62, LC3 i Beclin1 ekspresiju. Primenom χ^2 testa tj. Fišerovog testa tačne verovatnoće vršena je analiza PD-L1, p62, LC3 i Beclin1 ekspresije različitih delova karcinoma u odnosu na histološke tipove karcinoma i ostale patohistološke parametre, kao i međusobno poređenje svih analiziranih markera u odnosu na ispitivane parametre. Korelacija između ekspresija markera autofagije, u odnosu na delove karcinoma je vršena primenom Kendall's Tau korelacionog koeficijenta (τ_b). Svi statistički testovi su tumačeni na nivou značajnosti nulte hipoteze od $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Demografski, klinički i patohistološki parametri

Istraživanje je obuhvatilo 328 pacijentkinja kojima je dijagnostikovao epitelni tumor jajnika. Eksperimentalnu grupu činile su 122 pacijentkinje sa ovarijanim karcinomima i 42 pacijentkinje sa APT tumorima. Kontrolnu grupu su predstavljale 164 pacijentkinje sa benignim epitelnim tumorima jajnika. Uključivši sve tri grupe, analiza prosečne starosti svih pacijentkinja je $52,41 \pm 15,77$. U grupi ovarijalnih karcinoma prosečna starost bila je $61,75 \pm 10,08$, što je statistički značajnije starija populacija ($p < 0,001$) u odnosu na pacijentkinje sa APT tumorima gde je prosek starosti $45,76 \pm 12,25$, kao i u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$) gde je prosek starosti $47,16 \pm 15,62$ (Tabela 4)

Od ukupnog broja pacijentkinja 60,7% je bilo u menopauzi, od čega je najveći broj pacijentkinja sa menopauzom u grupi EOC (86,9%), manji u kontrolnoj grupi (44,5%) i grupi sa APT tumorima (47,6%). Pokazana je statistički značajnija zastupljenost žena u menopauzi u grupi EOC ($p < 0,001$) u odnosu na ostale grupe pacijentkinja (Tabela 4).

Tabela 4. Demografske karakteristike pacijentkinja, histološki tip i FIGO stadijum tumora u odnosu na analizirane grupe pacijentkinja (n=328)

Parametri	Grupe			OK vs. APT	OK vs. BOT	APT vs. BOT
	OK n=122	APT n=42	BOT n=164			
Starost (god.), mean±sd	61,75±10,08	45,76±12,25	47,16±15,62	<0,001	<0,001	0,834
Menopauzalni status, n (%)						
Da	106 (86,9)	20 (47,6)	73 (44,5)	<0,001	<0,001	0,718
Ne	16 (13,1)	22 (52,4)	91 (55,5)			
Histološki tip, n (%)						
Serozni	103 (84,4)	25 (59,5)	78 (47,6)	<0,001	<0,001	0,044
Mucinozni	10 (8,2)	16 (38,1)	86 (52,4)			
Endometrioidni	9 (7,4)	1 (2,4)	0 (0,0)			
FIGO stadijum, n (%)						
I+II	39 (32,0)	42 (100,0)	/	<0,001	/	/
III+IV	83 (68,0)	0 (0,0)	/			

OK- Ovarijalni karcinom, APT- Atipično proliferišući tumor, BOT- Benigni ovarijalni tumor, FIGO- Internacionalano udruženje ginekologa i akušera

Najčešći histološki tip ovarijalnog karcinoma je serozni koji je dijagnostikovao kod 103 pacijentkinje (62,8% svih ispitivanih tumora). U grupi ovarijalnih karcinoma zastupljenost seroznog tipa je 84,4% što je značajno više u odnosu na ostale histološke tipove (mucinozni 8,2%, endometrioidni 7,4%). Učestalost histoloških podtipova seroznog ovarijalnog karcinoma kao što je *high grade* serozni karcinom (HGSC) je 88,4% (91 pacijentkinja), dok je *low grade* serozni karcinom (LGSC) bio prisutan kod 12 pacijentkinja (11,6%). U grupi APT tumora veći je broj seroznih histoloških tipova (59,5%) u odnosu na mucinozne (38,1%) i posebno u odnosu na sporadične endometrioidne APT tumore (2,4%). Prisutna je statistički značajna razlika u zastupljenosti histoloških tipova među ispitivanim grupama pacijentkinja ($p < 0,001$) (**Tabela 4**).

Većina ovarijalnih karcinoma su u FIGO stadijumu I ili III. Najzastupljenije su pacijentkinje u FIGO III stadijumu (82 pacijentkinje). FIGO II je pokazalo 9,8% ovarijalnih karcinoma, dok je IV stadijum imalo samo 0,8% pacijentkinja.

Maksimalan promer tumora se nalazio u rasponu od 18 do 310 mm (prosečna vrednost 90 mm). Najmanji tumor pripada grupi malignih tumora i veličine je 18 mm, dok je najveći tumor od 310 mm dijagnostikovao kao APT tumor. Statistički značajno veći tumori bili su u grupi APT (100mm) u odnosu na grupu OK (80mm) ($p = 0,028$). Zastupljenost bilateralnih tumora u grupi ovarijalnih karcinoma (67%) značajnija je ($p < 0,001$) u odnosu na APT tumore (14%) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Kliničke i patohistološke karakteristike ovarijalnih karcinoma

Karakteristike	Ukupno	OK	APT	p
Maks. promer tumora (mm), medijana (raspon)	90 (18-310)	80 (18-245)	100 (30-310)	0,028
Lateralnost tumora				
Unilateralna	76 (46,3)	40 (32,8)	36 (85,7)	<0,001
Bilateralna	88 (53,7)	82 (67,2)	6 (14,3)	
Gradus tumora, n (%)				
1	57 (34,8)	15 (12,3)	42 (100)	<0,001
2	12 (12)	12 (9,8)	/	
3	95 (57,9)	95 (77,9)	/	
Limfovaskularna invazija, n (%)	103 (62,8)	103 (84,4)	/	<0,001
Nekroza, n (%)	97 (59,1)	97 (79,5)	/	<0,001
Intratumorska limfocitna infiltracija, n (%)	103 (62,8)	99 (81,1)	4 (9,5)	<0,001
Peritumorska limfocitna infiltracija, n (%)	119 (72,6)	110 (90,2)	9 (21,4)	<0,001

OK- Ovarijalni karcinom, APT- Atipično proliferišući tumor

U grupi OK najveći broj tumora je bio histološkog gradusa 3 (95/122- 77,9%). Samo 12 pacijentkinja (9,8%) je imalo karcinome gradusa 2, a 15 (12,3%) gradusa 1. Najveći procenat tumora visokog histološkog gradusa zabeležen je u grupi seroznih OK jer je 91/103- 88,3% tumora bilo tipa HGSC. To je upadljivo više od procenta tumora visokog gradusa u grupi mucinoznih karcinoma (10,0%) i endometrioidnih karcinoma (33,3%). Mucinozni ovarijalni karcinomi su u najvećem broju bili dobro do srednje diferentovani (90,0%). Nije postojala značajna razlika između tumorskih gradusa mucinoznih i endometrioidnih ovarijalnih karcinoma ($p=0,213$). Prisustvo limfovaskularne tumorske invazije i nekroze bilo je najučestalije kod seroznih ovarijalnih karcinoma (92,9 % i 85,4%), što se pokazalo kao značajno ($p<0,001$) u odnosu na limfovaskularnu invaziju i nekrozu kod mucinoznih (40,0% i 50,0%) i endometrioidnih (44,4% oba parametra) karcinoma. Mucinozni ovarijalni karcinomi nisu pokazivali statistički značajnu razliku u učestalosti nalaza limfovaskularne invazije i tumorske nekroze u odnosu na endometrioidne karcinome ($p=1,000$). Intratumorska i peritumorska limfocitna infiltracija kod seroznih OK (86,4% i 93,2%) je značajno učestalija u odnosu na njihovo prisustvo u mucinoznim (30,0% i 60,0%) i endometrioidnim (77,8% i 88,9%) OK ($p<0,001$; $p=0,008$; $p<0,001$; $p=0,003$). Endometrioidni i mucinozni ovarijalni karcinomi nemaju međusobno značajnu razliku prisustva limfocitnog infiltrata ($p=0,070$; $p=0,303$) (**Tabela 6**).

Tabela 6. Karakteristike ovarijalnih karcinoma u odnosu na histološki tip (n=122)

Karakteristike	Histološki tip karcinoma			p ^a	p ^b	p ^c
	Serozni	Mucinozni	Endometrioidni			
Dobro i srednje diferentovani (Gradus 1 + Gradus 2)	12 (11,7)	9 (90,0)	6 (66,7)	<0,001	<0,001	0,213
Slabo diferentovani (Gradus 3)	91 (88,3)	1 (10,0)	3 (33,3)			
Limfovaskularna invazija, n (%)	95 (92,2)	4 (40,0)	4 (44,4)	<0,001	<0,001	1,000
Nekroza, n (%)	88 (85,4)	5 (50,0)	4 (44,4)	0,005	0,001	1,000
Intratumorska limfocitna infiltracija, n (%)	89 (86,4)	3 (30,0)	7 (77,8)	<0,001	<0,001	0,070
Peritumorska limfocitna infiltracija, n (%)	96 (93,2)	6 (60,0)	8 (88,9)	0,008	0,003	0,303

^aSerozni vs. Mucinozni, ^bSerozni vs. Endometrioidni, ^cMucinozni vs. Endometrioidni.
OK- Ovarijalni karcinom

Limfovaskularna invazija i nekroza bile su značajno učestalije u HGSC nego u LGSC (p=0,006; p=0,005). Takođe intratumorska i peritumorska limfocitna infiltracija bile su značajno češće u HGSC u odnosu na LGSC (p=0,034; p=0,033) (Tabela 7).

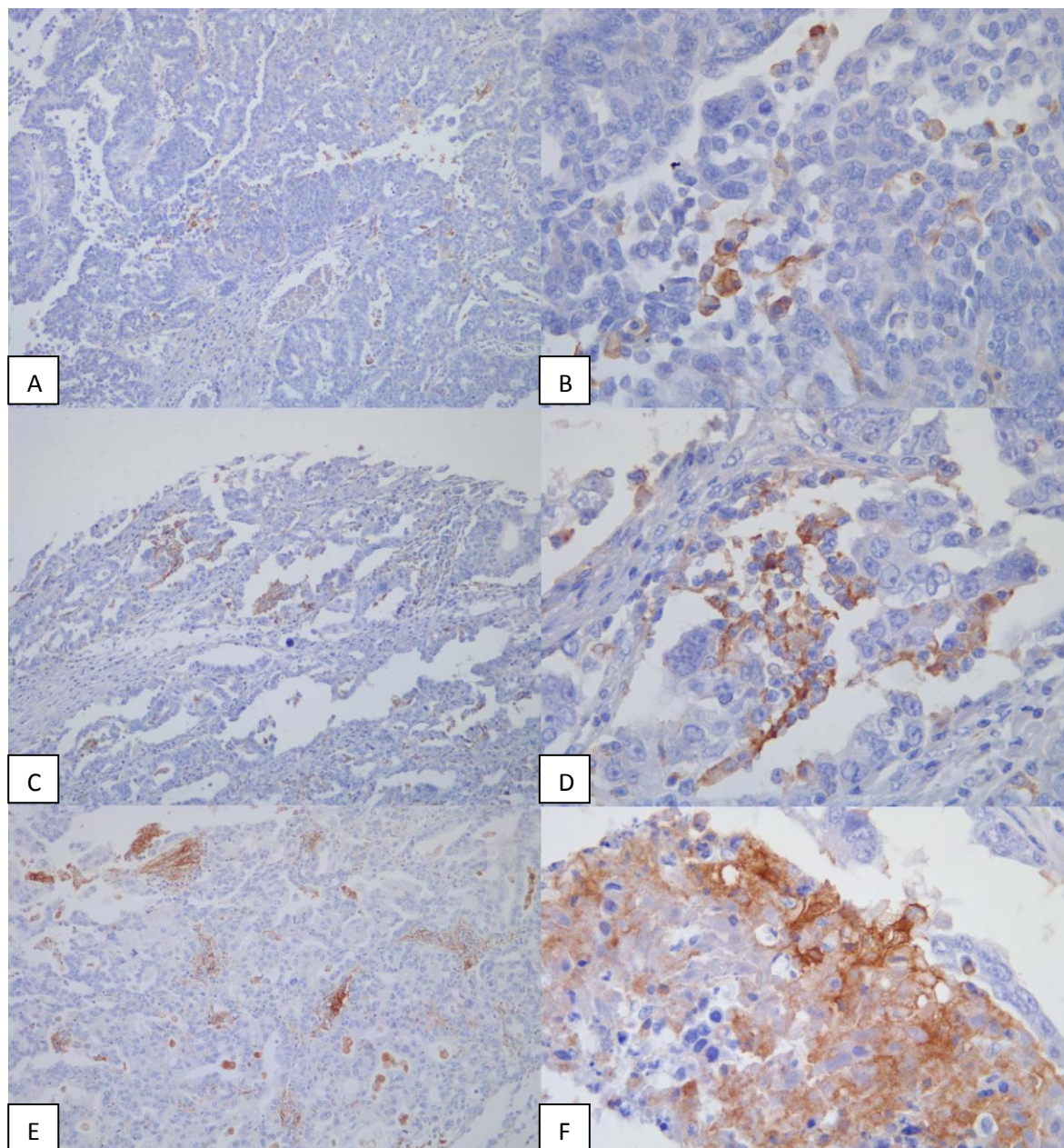
Tabela 7. Karakteristike seroznih ovarijalnih karcinoma (n=103)

Karakteristike	Serozni OK		p
	HGSC	LGSC	
Limfovaskularna invazija, n (%)	87 (95,6)	8 (66,7)	0,006
Nekroza, n (%)	81 (89,0)	7 (58,3)	0,005
Intratumorska limfocitna infiltracija, n (%)	81 (89,0)	8 (66,7)	0,034
Peritumorska limfocitna infiltracija, n (%)	87 (95,6)	9 (75,0)	0,033

OK- Ovarijalni karcinom, HGSC- High grade serozni karcinom,
 LGSC- Low grade serozni karcinom

4.2. Rezultati analize ekspresije PD-L1 markera

PD-L1 ekspresija u našoj studiji je najizraženija kod ovarijalnih karcinoma (**Slika 6**). U grupi APT tumora i kontrolnoj grupi PD-L1 ekspresija je statistički značajno slabija. Visoku PD-L1 ekspresiju pokazalo je 88 pacijentkinja (72,1%) sa ovarijalnim karcinomom, dok je takvih pacijentkinja sa APT tumorima bilo svega 5 (11,9%). Grupa APT tumora jajnika najčešće ispoljava slabu PD-L1 ekspresiju prisutnu kod 30 pacijentkinja (71,4%). Benigni tumori jajnika u kontrolnoj grupi su najčešće pokazali odsustvo PD-L1 ekspresije (97%) (**Tabela 8**).



Slika 6. PD-L1 ekspresija u karcinomskim ćelijama HGSC

A (x100) i B (x400) slaba ekspresija, C (x100) i D (x400) umerena ekspresija, E (x100) i F (x400) jaka PD-L1 ekspresija.

Tabela 8. PD-L1 ekspresija u različitim grupama pacijentkinja (n=328)

Stepen PD-L1 ekspresije	Grupe n (%)			p	OK vs. APT	OK vs. BOT	APT vs. BOT
	OK n=122	APT n=42	BOT n=164				
0	0 (0,0)	7 (16,7)	159 (97,0)				
1+	34 (27,9)	30 (71,4)	5 (3,0)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
2+	86 (70,5)	5 (11,9)	0 (0,0)				
3+	2 (1,6)	0 (0,0)	0 (0,0)				

OK- Ovarijalni karcinom, APT- Atipično proliferišući tumor, BOT- Benigni ovarijalni tumor

Bilateralni ovarijalni karcinomi pokazuju statistički značajniju visoku PD-L1 ekspresiju ($p < 0,001$) u odnosu na unilateralne (82,9%; 50,0%). Stepenn PD-L1 ekspresije se nije razlikovao u odnosu na starost pacijentkinja, njihov menopauzalni status i veličinu tumora. Svi karcinomi gradusa 1 najčešće su ispoljavali slabu PD-L1 ekspresiju, dok su kategorije umerene i jake PD-L1 ekspresije kod ovakvih karcinoma izostale. Visok stepen ekspresije PD-L1 bio je značajno češći u OK sa prisutnom nekrozom (80,4%), limfovaskularnom invazijom (82,5%) i prisutnim intratumorskim (79,8%) ili peritumorskim (75,5%) limfocitnim infiltratom u odnosu na OK bez pomenutih karakteristika (**Tabela 9**). Serozni ovarijalni karcinomi pokazuju najizraženiju visoku PD-L1 ekspresiju (79,6%), statistički značajno višu ($p < 0,001$) u odnosu na mucinozne (30,0%) i endometrioidne (33,3%) karcinome. Visoka PD-L1 ekspresija je značajno češća ($p = 0,007$) u HGSC (83,5%), nego kod LGSC (50,0%). Viši FIGO stadijum tumorske bolesti (III i IV) povezan je sa značajno višim stepenom ekspresije PD-L1 u odnosu na niži stadijum (95,2%; 23,1%). U OK visokog histološkog gradusa (gradus 3) visok stepen PD-L1 ekspresije bio je najčešći (84,2%). U OK gradusa 2 visok stepen ekspresije imalo je 66,7% tumora.

Tabela 9. PD-L1 ekspresija u odnosu na kliničke i patohistološke karakteristike ovarijalnih karcinoma (n=122)

Karakteristike	Kategorije	PD-L1 ekspresija		p
		1+	≥2+	
Starost pacijentkinje	<65	21 (31,8)	45 (68,2)	0,291
	65+	13 (23,2)	43 (76,8)	
Menopauzalni status	Da	28 (26,4)	78 (73,6)	0,357
	Ne	6 (37,5)	10 (62,5)	
Lateralnost tumora	Unilateralna	20 (50,0)	20 (50,0)	<0,001
	Bilateralna	14 (17,1)	68 (82,9)	
Maks. promer tumora (mm)	<80	14 (24,6)	43 (75,4)	0,445
	≥80	20 (30,8)	45 (69,2)	
Histološki tip	Serozni	21 (20,4)	82 (79,6)	<0,001
	Mucinozni	7 (70,0)	3 (30,0)	
	Endometrioidni	6 (66,7)	3 (33,3)	
Histološki podtip	HGSC	15 (16,5)	76 (83,5)	<0,001
	LGSC	6 (50,0)	6 (50,0)	
	Mucinozni	7 (70,0)	3 (30,0)	
	Endometrioidni	6 (66,7)	3 (33,3)	
Serozni	HGSC	15 (16,5)	76 (83,5)	0,007
	LGSC	6 (50,0)	6 (50,0)	
FIGO stadijum	I+II	30 (76,9)	9 (23,1)	<0,001
	III+IV	4 (4,8)	79 (95,2)	
Gradus	1	15 (100,0)	0 (0,0)	<0,001
	2	4 (33,3)	8 (66,7)	
	3	15 (15,8)	80 (84,2)	
Nekroza	Da	19 (19,6)	78 (80,4)	<0,001
	Ne	15 (60,0)	10 (40,0)	
Limfovaskularna invazija	Da	18 (17,5)	85 (82,5)	<0,001
	Ne	16 (84,2)	3 (15,8)	
Intratumorska limfocitna infiltracija	Da	20 (20,2)	79 (79,8)	<0,001
	Ne	14 (60,9)	9 (39,1)	
Peritumorska limfocitna infiltracija	Da	27 (24,5)	83 (75,5)	0,013
	Ne	7 (58,3)	5 (41,7)	

FIGO- Internacionalano udruženje ginekologa i akušera, HGSC- High grade serozni karcinom, LGSC- Low grade serozni karcinom

Karakteristike PD-L1 ekspresije u centralnim delovima tumora, a u odnosu na FIGO stadijum tumorskog procesa prikazane su u **Tabeli 10**. Karakteristike PD-L1 ekspresije u perifernim delovima tumora (invazivni front karcinoma), a u odnosu na FIGO stadijum tumorskog procesa prikazane su u **Tabeli 11**.

Tabela 10. PD-L1 ekspresija u centralnim delovima ovarijalnih karcinoma u odnosu na FIGO stadijume

FIGO stadijum	Stepen PD-L1 ekspresije n(%)		
	Svi stepeni	1+	≥2+
Svi stadijumi	122 (100)	34 (27,9)	88 (72,1)
IA	6 (4,9)	6 (100)	0 (0,0)
IB	1 (0,8)	1 (100)	0 (0,0)
IC1	10 (8,2)	7 (70,0)	3 (30,0)
IC2	9 (7,4)	8 (88,9)	1 (11,1)
IC3	1 (0,8)	1 (100)	0 (0,0)
IIA	7 (5,7)	4 (57,1)	3 (42,9)
IIB	2 (1,6)	1 (50,0)	1 (50,0)
IIC	3 (2,5)	2 (66,7)	1 (33,3)
IIIA	4 (3,3)	1 (25,0)	3 (75,0)
IIIA1	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)
IIIB	6 (4,9)	0 (0,0)	6 (100)
IIIC	71 (58,2)	3 (4,2)	68 (95,8)
IV	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)

Tabela 11. PD-L1 ekspresija u invazivnom frontu ovarijalnih karcinoma u odnosu na FIGO stadijume

FIGO stadijum	Stepen PD-L1 ekspresije n(%)		
	Svi stepeni	1+	≥2+
Svi stadijumi	122 (100)	12 (9,8)	110 (90,2)
IA	6 (4,9)	5 (83,3)	1 (16,7)
IB	1 (0,8)	1 (100)	0 (0,0)
IC1	10 (8,2)	3 (30,0)	7 (70,0)
IC2	9 (7,4)	2 (22,2)	7 (77,8)
IC3	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)
IIA	7 (5,7)	1 (14,3)	6 (85,7)
IIB	2 (1,6)	0 (0,0)	2 (100)
IIC	3 (2,5)	0 (0,0)	3 (100)
IIIA	4 (3,3)	0 (0,0)	4 (100)
IIIA1	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)
IIIB	6 (4,9)	0 (0,0)	6 (100)
IIIC	71 (58,2)	0 (0,0)	71 (100)
IV	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)

4.2.1. Poređenje PD-L1 ekspresije u centralnim i invazivnim delovima ovarijalnih karcinoma

Invazivni delovi ovarijalnih karcinoma pokazuju izraženiju PD-L1 ekspresiju u odnosu na centralne ($p < 0,001$) (**Tabela 12**). Visoka PD-L1 ekspresija učestalija je u invazivnim nego u centralnim delovima ovarijalnih karcinoma (90,2%; 72,1%). Invazivni delovi karcinoma najčešće pokazuju umerenu PD-L1 ekspresiju (66,4%) koja je najzastupljenija i u centralnim segmentima karcinoma (70,5%). Jaka PD-L1 ekspresija je nasuprot umerenoj češća u invazivnim nego u centralnim delovima karcinoma (23,8%; 1,6%). Centralni delovi karcinoma slabo ispoljavaju PD-L1 receptor kod 34 pacijentkinje (27,9%), dok je u invazivnim delovima ista ekspresija prisutna kod samo njih 12.

Tabela 12. Stepen PD-L1 ekspresije u odnosu na delove karcinoma jajnika (n=122)

Regija tumora	Stepen PD-L1 ekspresije	n (%)	p
Centralni delovi	1+	34 (27,9)*	<0,001
	2+	86 (70,5)*	
	3+	2 (1,6)*	
Invazivni front	1+	12 (9,8)*	<0,001
	2+	81 (66,4)*	
	3+	29 (23,8)*	

* $p < 0,001$ (Razlika u distribuciji ekspresije između centralnih i invazivnih zona tumora)

Postojale su značajne razlike u ekspresiji PD-L1 između centralnih i perifernih zona tumora, u odnosu na histološki tip karcinoma (**Tabela 13**). HGSC je u invazivnim delovima pokazao značajnu učestalost visoke (96,7%), pre svega jake (30,8%) PD-L1 ekspresije u odnosu na centralne karcinomske delove. U grupama LGSC, mucinoznog i endometrioidnog karcinoma nije bilo značajnih razlika u ekspresiji PD-L1 između invazivnih i centralnih karcinomskih delova (**Tabela 13**).

Tabela 13. Razlike PD-L1 ekspresije u centralnim i invazivnim delovima ovarijalnih karcinoma u odnosu na histološke tipove

Histološki tip tumora	Stepen PD-L1 ekspresije	Regija tumora		P
		Centralni deo n (%)	Invazivni front n (%)	
HGSC	1+	15 (16,5)	3 (3,3)	<0,001
	2+	74 (81,3)	60 (65,9)	
	3+	2 (2,2)	28 (30,8)	
LGSC	1+	6 (50,0)	1 (8,3)	0,069
	2+ i 3+	6 (50,0)	11 (91,7)	
Mucinozni karcinom	1+	7 (70,0)	5 (50,0)	0,650
	2+	3 (30,0)	5 (50,0)	
Endometrioidni karcinom	1+	6 (66,7)	3 (33,3)	0,347
	2+	3 (33,3)	6 (66,7)	

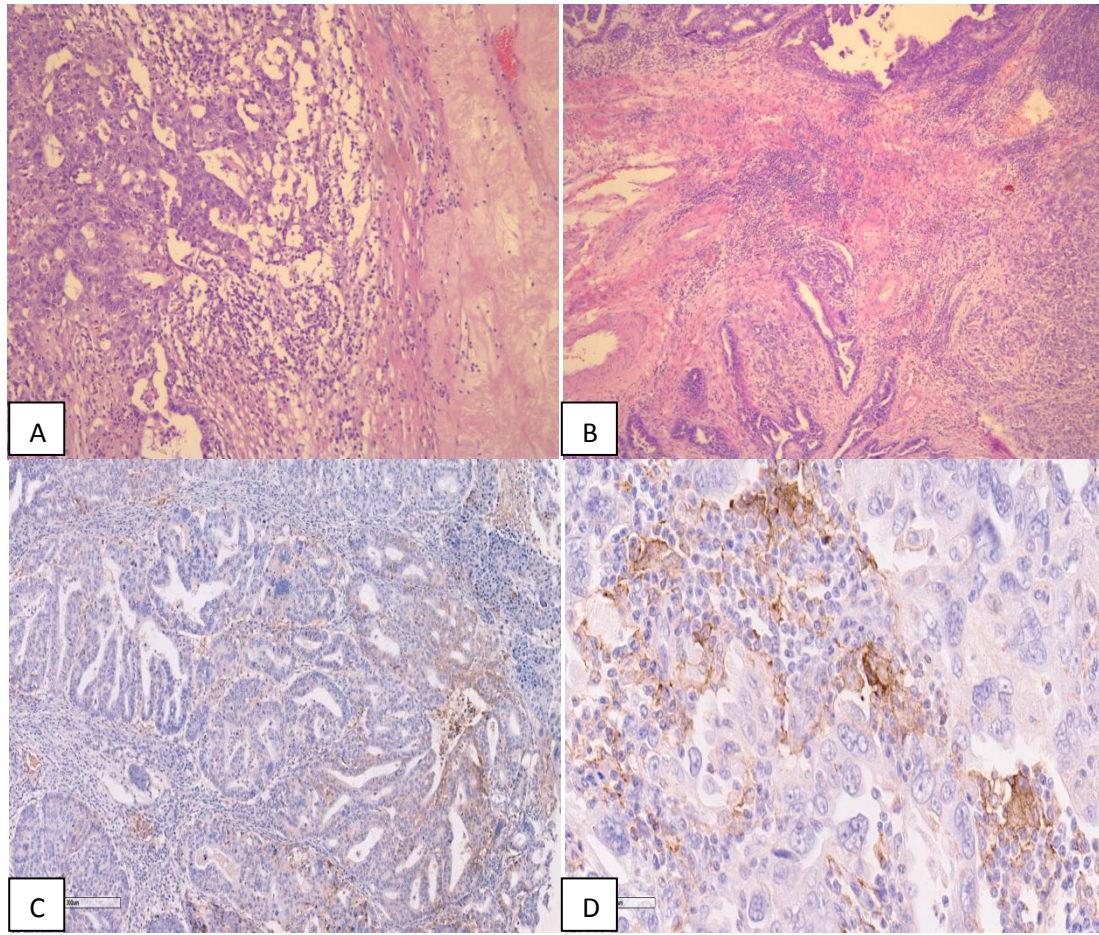
HGSC- High grade serozni karcinom, LGSC- Low grade serozni karcinom

Analizirana je povezanost stepena PD-L1 ekspresije centralnih i invazivnih delova HGSC ovarijalnih karcinoma sa tipom limfocitnog infiltrata (intratumorski i peritumorski) (Tabela 14, Slika 7). Pokazana je značajno veća učestalost visoke PD-L1 ekspresije u centralnim delovima karcinoma (84,3%) u kojima postoji intratumorski limfocitni infiltrat u odnosu na tumore u kojima tog infiltrata nema (p=0,003).

Tabela 14. Stepeni PD-L1 ekspresije u HGSC u odnosu na postojanje i tip limfocitnog infiltrata (n=91)

Regija tumora	Stepen PD-L1 ekspresije	Intratumska limfocitna infiltracija		P	Peritumska limfocitna infiltracija		P
		Da	Ne		Da	Ne	
Centralni delovi	odsutna/slaba*	14 (15,7)	7 (50,0)	0,003	18 (18,8)	3 (42,9)	0,126
	visoka**	75 (84,3)	7 (50,0)		78 (81,3)	4 (57,1)	
Invazivni front	odsutna/slaba*	2 (2,2)	2 (14,3)	0,088	3 (3,1)	1 (14,3)	0,249
	visoka**	87 (97,8)	12 (85,7)		93 (96,9)	6 (85,7)	

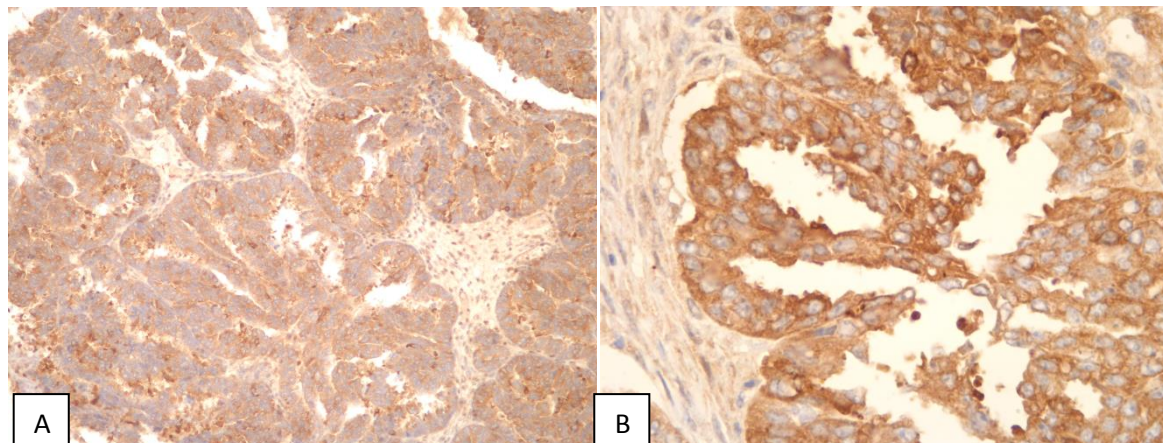
* odsutna/slaba PD-L1 ekspresija (0 i 1+), **visoka PD-L1 ekspresija (2+ i 3+)



Slika 7. Intratumorski (A) i peritumorski (B) limfocitni infiltrat (A) u HGSC histološkom tipu ovarijalnog karcinoma. Značajna PD-L1 imunoekspresija u centralnim delovima HGSC sa prisutnim intratumorskim limfocitnim infiltratom na uveličanju x100 (C) i uveličanju x400 (D).

4.3. Rezultati analize ekspresije p62 markera

Karakteristike imunoekspresije markera autofagije p62 (Slika 8), kao i uporedne statističke analize te ekspresije, prikazane su u Tabeli 15.



Slika 8. Ekspresija p62 markera u karcinomskim ćelijama HGSC jajnika na uvećanju x100 (A) i uvećanju x400 (B).

Tabela 15. Ekspresija p62 markera u centralnim delovima, u odnosu na tipove uzoraka

Stepen ekspresije	Grupe n (%)			OK vs. APT	OK vs. BOT	APT vs. BOT
	OK	APT	BOT			
0	0 (0,0)	6 (14,3)	149 (90,9)			
1+	3 (2,5)	21 (50,0)	15 (9,1)	<0,001	<0,001	<0,001
2+	43 (35,2)	15 (35,7)	0 (0,0)			
3+	76 (62,3)	0 (0,0)	0 (0,0)			
Pozitivna ekspresija	122 (100)*	36 (85,7)*	15 (9,1)*			

*p<0,001;

OK - Ovarijalni karcinom, APT - Atipično proliferišući tumor, BOT - Benigni ovarijalni tumor

Stepen p62 ekspresije se nije razlikovao u odnosu na starost pacijentkinja, njihov menopauzalni status, lateralnost i maksimalni promer tumora. Serozni histološki tip ovarijalnog karcinoma (posebno HGSC) je imao statistički značajno viši stepen ekspresije p62 markera ($\geq 2+$) u poređenju sa preostala dva histološka tipa (mucinozni i endometrioidni). Viši FIGO stadijumi tumorske bolesti (III i IV) su pokazali značajno češće visoku p62 ekspresiju u odnosu na niže FIGO stadijume (100,0%; 92,3%). Sva tri gradusa OK su imali

značajno visok stepen ekspresije p62, međutim gradusi 2 i 3 ovarijalnih karcinoma su pokazali značajno češće visoku p62 ekspresiju (100%) u odnosu na gradus 1 (80%). Visoka p62 ekspresija je značajno češće uočena kod ovarijalnih karcinoma sa prisutnom nekrozom (99%), limfovaskularnom invazijom (100%) i prisutnim intratumorskim (100%) ili peritumorskim (99,1%) limfocitnim infiltratom (**Tabela 16**).

Tabela 16. Ekspresija p62 u odnosu na kliničke i patohistološke karakteristike ovarijalnih karcinoma

Karakteristike	Kategorije	Ekspresija p62		p
		1+	≥2+	
Starost pacijentkinje (god.)	<65	2 (3,0)	64 (97,0)	0,658
	≥65	1 (1,8)	55 (98,2)	
Menopauzalni status	Da	2 (1,9)	104 (98,1)	0,347
	Ne	1 (6,3)	15 (93,8)	
Lateralnost tumora	Unilateralna	1 (2,5)	39 (97,5)	1,000
	Bilateralna	2 (2,4)	80 (97,6)	
Maks. promer tumora (mm)	<80	0 (0,0)	57 (100,0)	0,101
	≥80	3 (4,6)	62 (95,4)	
Histološki tip	Serozni	0 (0,0)	103 (100,0)	0,003
	Mucinozni	2 (20,0)	8 (80,0)	
	Endometrioidni	1 (11,1)	8 (88,9)	
Histološki podtip	HGSC	0 (0,0)	91 (100,0)	0,004
	LGSC	0 (0,0)	12 (100,0)	
	Mucinozni	2 (20,0)	8 (80,0)	
	Endometrioidni	1 (11,1)	8 (88,9)	
Serozni	HGSC	0 (0,0)	91 (100,0)	/
	LGSC	0 (0,0)	12 (100,0)	
FIGO stadijum	I+II	3 (7,7)	36 (92,3)	0,031
	III+IV	0 (0,0)	83 (100,0)	
Gradus	1	3 (20,0)	12 (80,0)	0,002
	2	0 (0,0)	12 (100,0)	
	3	0 (0,0)	95 (100,0)	
Nekroza	Da	1 (1,0)	96 (99,0)	0,106
	Ne	2 (8,0)	23 (92,0)	
Limfovaskularna invazija	Da	0 (0,0)	103 (100,0)	0,003
	Ne	3 (15,8)	16 (84,2)	
Intratumorska limfocitna infiltracija	Da	0 (0,0)	99 (100,0)	0,006
	Ne	3 (13,0)	20 (87,0)	
Peritumorska limfocitna infiltracija	Da	1 (0,9)	109 (99,1)	0,025
	Ne	2 (16,7)	10 (83,3)	

FIGO- Internacionalano udruženje ginekologa i akušera, HGSC- High grade serozni karcinom, LGSC- Low grade serozni karcinom

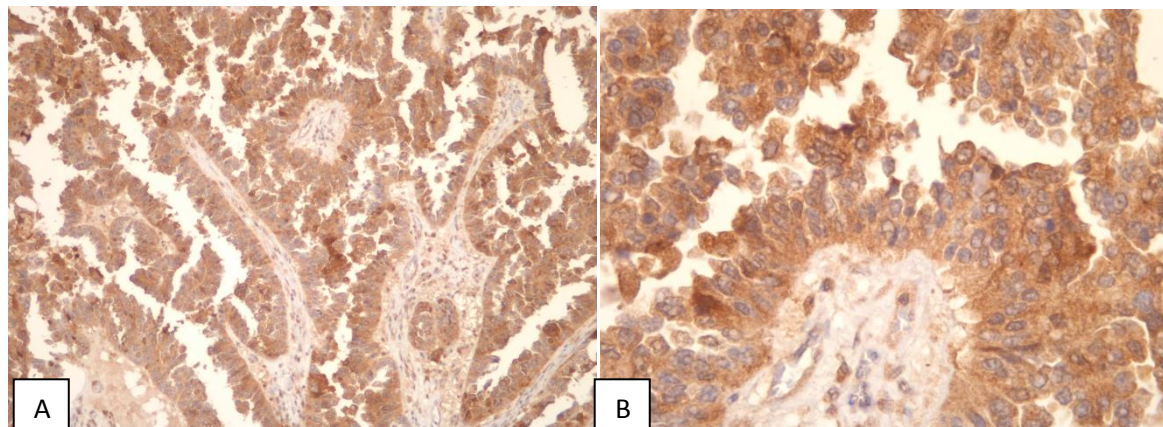
Karakteristike ekspresije p62 u centralnim delovima OK u odnosu na FIGO stadijume je prikazana u **Tabeli 17**.

Tabela 17. Ekspresija p62 u centralnim delovima ovarijalnih karcinoma u odnosu na FIGO stadijume

FIGO stadijum	Stepen p62 ekspresije n(%)		
	Svi stepeni	1+	≥2+
Svi stadijumi	122 (100)	3 (2,5)	119 (97,5)
IA	6 (4,9)	2 (33,3)	4 (66,7)
IB	1 (0,8)	1 (100)	0 (0,0)
IC1	10 (8,2)	0 (0,0)	10 (100)
IC2	9 (7,4)	0 (0,0)	9 (100)
IC3	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)
IIA	7 (5,7)	0 (0,0)	7 (100)
IIB	2 (1,6)	0 (0,0)	2 (100)
IIC	3 (2,5)	0 (0,0)	3 (100)
IIIA	4 (3,3)	0 (0,0)	4 (100)
IIIA1	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)
IIIB	6 (4,9)	0 (0,0)	6 (100)
IIIC	71 (58,2)	0 (0,0)	71 (100)
IV	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)

4.4. Rezultati analize ekspresije LC3 markera

Karakteristike imunoekspresije markera autofagije LC3 (Slika 9), kao i uporedne statističke analize te ekspresije, prikazane su u Tabeli 18.



Slika 9. Ekspresija LC3 markera u karcinomskim ćelijama HGSC jajnika na uveličanju x100 (A) i uveličanju x400 (B).

Tabela 18. Ekspresija LC3 markera u centralnim delovima, u odnosu na tipove uzoraka

Stepen ekspresije	Grupe n (%)			OK vs. APT	OK vs. BOT	APT vs. BOT
	OK	APT	BOT			
0	0 (0,0)	9 (21,4)	149 (90,9)			
1+	3 (2,5)	22 (52,4)	15 (9,1)	<0,001	<0,001	<0,001
2+	35 (28,7)	11 (26,2)	0 (0,0)			
3+	84 (68,9)	0 (0,0)	0 (0,0)			
Pozitivna ekspresija	122 (100)*	33 (78,6)*	15 (9,1)*			

*p<0,001;

OK - Ovarijalni karcinom, APT - Atipično proliferišući tumor, BOT - Benigni ovarijalni tumor

Stepen LC3 ekspresije se nije razlikovao u odnosu na starost pacijentkinja, njihov menopauzalni status, lateralnost i maksimalni promer tumora. Serozni histološki tip ovarijalnog karcinoma (posebno HGSC) je statistički značajno češće pokazivao visok stepen ekspresije LC3 markera ($\geq 2+$) u poređenju sa mucinoznim i endometrioidnim OK ($p < 0,001$). Viši FIGO stadijumi tumorske bolesti (III i IV) su pokazali značajno češće visoku LC3 ekspresiju u odnosu na niže FIGO stadijume (100,0%; 92,3%). Sva tri gradusa ovarijalnih

karcinoma pokazuju izraženu učestalost LC3 ekspresije, od čega karcinomi gradusa 2 i 3 imaju značajno češće visoku LC3 ekspresiju (100%) u odnosu na gradus 1 (80%). Visoka LC3 ekspresija je značajno češće uočena kod ovarijalnih karcinoma sa prisustvom limfovaskularne invazije (100%), intratumorskim (100%) ili peritumorskim (99,1%) limfocitnim infiltratom, dok je visok stepen LC3 ekspresije bio prisutan kod OK bez obzira na prisustvo nekroze (Tabela 19).

Tabela 19. Ekspresija LC3 u odnosu na kliničke i patohistološke karakteristike karcinoma ovarijuma

Karakteristike	Kategorije	LC3 ekspresija		p
		1+	≥2+	
Starost pacijentkinje (god.)	<65	1 (1,5)	65 (98,5)	0,465
	≥65	2 (3,6)	54 (96,4)	
Menopauzalni status	Da	3 (2,8)	103 (97,2)	1,000
	Ne	0 (0,0)	16 (100,0)	
Lateralnost tumora	Unilateralna	1 (2,5)	39 (97,5)	1,000
	Bilateralna	2 (2,4)	80 (97,6)	
Maks. promer tumora (mm)	<80	0 (0,0)	57 (100,0)	0,101
	≥80	3 (4,6)	62 (95,4)	
Histološki tip	Serozni	0 (0,0)	103 (100,0)	0,001
	Mucinozni	3 (30,0)	7 (70,0)	
	Endometrioidni	0 (0,0)	9 (100,0)	
Histološki podtip	HGSC	0 (0,0)	91 (100,0)	0,001
	LGSC	0 (0,0)	12 (100,0)	
	Mucinozni	3 (30,0)	7 (70,0)	
	Endometrioidni	0 (0,0)	9 (100,0)	
Serozni	HGSC	0 (0,0)	91 (100,0)	/
	LGSC	0 (0,0)	12 (100,0)	
FIGO stadijum	I+II	3 (7,7)	36 (92,3)	0,031
	III+IV	0 (0,0)	83 (100,0)	
Gradus	1	3 (20,0)	12 (80,0)	0,002
	2	0 (0,0)	12 (100)	
	3	0 (0,0)	95 (100,0)	
Nekroza	Da	1 (1,0)	96 (99,0)	0,106
	Ne	2 (8,0)	23 (92,0)	
Limfovaskularna invazija	Da	0 (0,0)	103 (100,0)	0,003
	Ne	3 (15,8)	16 (84,2)	
Intratumorska limfocitna infiltracija	Da	0 (0,0)	99 (100,0)	0,006
	Ne	3 (13,0)	20 (87,0)	
Peritumorska limfocitna infiltracija	Da	1 (0,9)	109 (99,1)	0,025
	Ne	2 (16,7)	10 (83,3)	

FIGO - Internacionalano udruženje ginekologa i akušera, HGSC - High grade serozni karcinom, LGSC - Low grade serozni karcinom

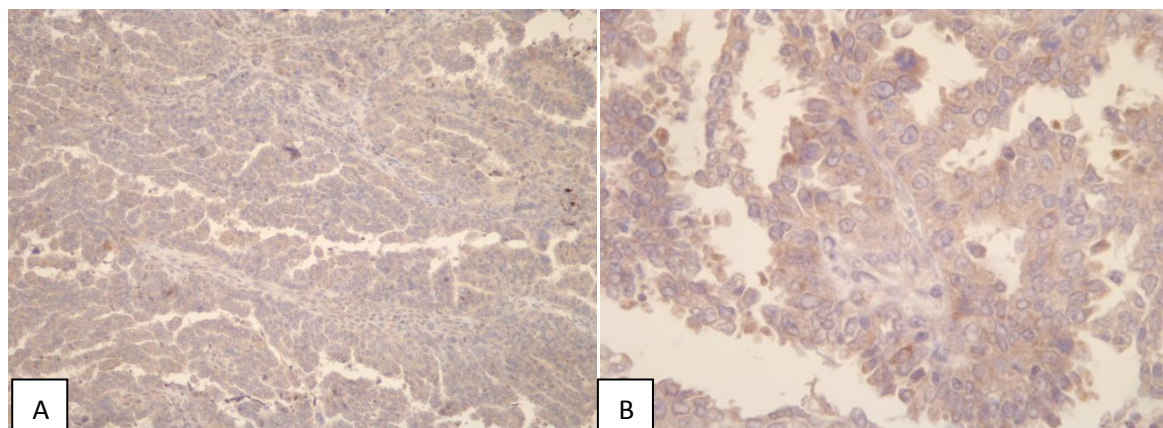
Karakteristike ekspresije LC3 u centralnim delovima OK u odnosu na FIGO stadijume je prikazana u **Tabeli 20**.

Tabela 20. Ekspresija LC3 u centralnim delovima ovarijalnih karcinoma u odnosu na FIGO stadijume

FIGO stadijum	Stepen LC3 ekspresije n(%)		
	Svi stepeni	1+	≥2+
Svi stadijumi	122 (100)	3 (2,5)	119 (97,5)
IA	6 (4,9)	2 (33,3)	4 (66,7)
IB	1 (0,8)	1 (100)	0 (0,0)
IC1	10 (8,2)	0 (0,0)	10 (100)
IC2	9 (7,4)	0 (0,0)	9 (100)
IC3	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)
IIA	7 (5,7)	0 (0,0)	7 (100)
IIB	2 (1,6)	0 (0,0)	2 (100)
IIC	3 (2,5)	0 (0,0)	3 (100)
IIIA	4 (3,3)	0 (0,0)	4 (100)
IIIA1	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)
IIIB	6 (4,9)	0 (0,0)	6 (100)
IIIC	71 (58,2)	0 (0,0)	71 (100)
IV	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)

4.5. Rezultati analize ekspresije Beclin1 markera

Karakteristike imunoekspresije markera autofagije Beclin1 (Slika 10), kao i uporedne statističke analize te ekspresije, prikazane su u Tabeli 21.



Slika 10. Ekspresija Beclin1 markera u karcinomskim ćelijama HGSC jajnika na uveličanju x100 (A) i uveličanju x400 (B).

Tabela 21. Ekspresija Beclin1 markera u centralnim delovima, u odnosu na tipove uzoraka

Stepen ekspresije	Grupe n (%)			OK vs. APT	OK vs. BOT	APT vs. BOT
	OK	APT	BOT			
0	0 (0,0)	12 (28,6)	162 (98,8)			
1+	15 (12,3)	21 (50,0)	2 (1,2)	<0,001	<0,001	<0,001
2+	60 (49,2)	9 (21,4)	0 (0,0)			
3+	47 (38,5)	0 (0,0)	0 (0,0)			
Pozitivna ekspresija	122 (100)*	30 (71,4)*	2 (1,2)*			

*p<0,001;

OK - Ovarijalni karcinom, APT - Atipično proliferišući tumor, BOT - Benigni ovarijalni tumor

Stepen Beclin1 ekspresije se nije značajno razlikovao u odnosu na svaki od analiziranih kliničkih i patohistoloških parametara (starost pacijentkinja, njihov menopauzalni status, lateralnost i maksimalni promer tumora, histološki tip i podtip, FIGO stadijum, gradus tumora, kao i prisustvo nekroze, limfovaskularne invazije, intratumorskog i peritumorskog limfocitnog infiltratata (Tabela 22).

Tabela 22. Ekspresija Beclin1 u odnosu na kliničke i patohistološke karakteristike ovarijalnih karcinoma

Karakteristike	Kategorije	Ekspresija Beclin1		p
		1+	≥2+	
Starost pacijentkinje (god.)	<65	6 (9,1)	60 (90,9)	0,242
	≥65	9 (16,1)	47 (83,9)	
Menopauzalni status	Da	15 (14,2)	91 (85,8)	0,108
	Ne	0 (0,0)	16 (100,0)	
Lateralnost tumora	Unilateralna	6 (15,0)	34 (85,0)	0,525
	Bilateralna	9 (11,0)	73 (89,0)	
Maks. promer tumora (mm)	<80	7 (12,3)	50 (87,7)	0,996
	≥80	8 (12,3)	57 (87,7)	
Histološki tip	Serozni	12 (11,7)	91 (88,3)	0,122
	Mucinozni	3 (30,0)	7 (70,0)	
	Endometrioidni	0 (0,0)	9 (100,0)	
Histološki podtip	HGSC	12 (13,2)	79 (86,8)	0,116
	LGSC	0 (0,0)	12 (100,0)	
	Mucinozni	3 (30,0)	7 (70,0)	
	Endometrioidni	0 (0,0)	9 (100,0)	
Serozni	HGSC	12 (13,2)	79 (86,8)	0,181
	LGSC	0 (0,0)	12 (100,0)	
FIGO stadijum	I+II	3 (7,7)	36 (92,3)	0,289
	III+IV	12 (14,5)	71 (85,5)	
Gradus	1	3 (20,0)	12 (80,0)	0,284
	2	0 (0,0)	12 (100)	
	3	12 (12,6)	83 (87,4)	
Nekroza	Da	11 (11,3)	86 (88,7)	0,527
	Ne	4 (16,0)	21 (84,0)	
Limfovaskularna invazija	Da	12 (11,7)	91 (88,3)	0,614
	Ne	3 (15,8)	16 (84,2)	
Intratumorska limfocitna infiltracija	Da	10 (10,1)	89 (89,9)	0,126
	Ne	5 (21,7)	18 (78,3)	
Peritumorska limfocitna infiltracija	Da	12 (10,9)	98 (89,1)	0,158
	Ne	3 (25,0)	9 (75,0)	

FIGO - Internacionalano udruženje ginekologa i akušera, HGSC - High grade serozni karcinom, LGSC - Low grade serozni karcinom

Karakteristike ekspresije Beclin1 u centralnim delovima OK u odnosu na FIGO stadijume je prikazana u **Tabeli 23**.

Tabela 23. Ekspresija Beclin1 u centralnim delovima ovarijalnih karcinoma u odnosu na FIGO stadijume

FIGO stadijum	Stepen Beclin1 ekspresije n(%)		
	Svi stepeni	1+	≥2+
Svi stadijumi	122 (100)	15 (12,3)	107 (87,7)
IA	6 (4,9)	2 (33,3)	4 (66,7)
IB	1 (0,8)	1 (100)	0 (0,0)
IC1	10 (8,2)	0 (0,0)	10 (100)
IC2	9 (7,4)	0 (0,0)	9 (100)
IC3	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)
IIA	7 (5,7)	0 (0,0)	7 (100)
IIB	2 (1,6)	0 (0,0)	2 (100)
IIC	3 (2,5)	0 (0,0)	3 (100)
IIIA	4 (3,3)	0 (0,0)	4 (100)
IIIA1	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (100)
IIIB	6 (4,9)	0 (0,0)	6 (100)
IIIC	71 (58,2)	11 (15,5)	60 (84,5)
IV	1 (0,8)	1 (100)	0 (0,0)

4.6. Poređenje ekspresija markera autofagije (p62, LC3 i Beclin1)

U **Tabeli 24** prikazani su rezultati ispitivanja korelacije imunoekspresije sva tri markera autofagije u odnosu na ekspresiju u centralnim delovima tumora i u perifernim, invazivnim delovima tumora. Prikazani su takođe i parametri međusobnih korelacija imunoekspresije za svaki od markera posebno. Može se zapaziti da je između ekspresije u centralnim i perifernim delovima tumora postojala pozitivna korelacija za svaki od tri markera ($p=0,001$). Pri ispitivanju međusobnih korelacija ekspresije ispitivanih markera, dobijena je pozitivna korelacija ekspresije p62 i LC3, dok je korelacija ova dva markera sa Beclin1 bila negativna i u centralnim i u perifernim, invazivnim delovima tumora.

Tabela 24. Poređenje markera autofagije u ovarijalnim karcinomima (n=122)

Ispitivane korelacije	Kendall's Tau korelacioni koeficijent (τ_b)
Centralni u odnosu na invazivni deo tumora	
p62/p62	0,946
LC3/LC3	0,994
Beclin1/Beclin1	0,963
Centralni delovi tumora	
p62/LC3	0,828
p62/Beclin1	-0,429
LC3/Beclin1	-0,352
Invazivni delovi tumora	
p62/LC3	0,839
p62/Beclin1	-0,429
LC3/Beclin1	-0,352

Grupisanjem manje zastupljenih histoloških tipova ovarijalnih karcinoma vršeno je udruženo poređenje ekspresija markera autofagije u odnosu na prognostički najznačajnije patohistološke parametre (histološki tip, gradus i stadijum tumora) uporednom analizom ekspresije centralnih delova ovarijalnih karcinoma (**Tabela 25**). U ovoj analizi ispitivane su razlike ekspresija svih markera u najzastupljenijem i najagresivnijem HGSC tipu u odnosu na sve ostale histološke tipove ovarijalnih karcinoma (LGSC, mucinozi i endometrioidni).

Ekspresija svih analiziranih markera je pokazala statistički značajnu povezanost sa histološkim tipom tumora, stadijumom i gradusom tumora ($p < 0,001$). Ekspresije p62 i LC3 markera su značajno zastupljene kod pacijentkinja sa HGSC histološkim tipom za razliku od Beclin1 ekspresije koja je slabija i zastupljenija u preostalim histološkim tipovima ovarijalnog karcinoma. Više ekspresije p62 i LC3 markera uočene su u uznapredovalim tumorskim stadijumima u odnosu na niže, što je različito u odnosu na Beclin1 ekspresiju. Diferencijacija tumora (gradus) pokazuje pozitivnu korelaciju sa p62 i LC3 ekspresijom i negativnu sa Beclin1 ekspresijom.

Tabela 25. Uporedna analiza ekspresije p62, LC3 i Beclin1 u centralnim delovima tumora u odnosu na histološki tip ovarijalnih karcinoma, gradus i stadijum tumora

	Histološki tip OK		FIGO stadijum		Gradus tumora		
	HGSC	non-HGSC	I i II	III i IV	1	2	3
p62, n (%)							
1+	0 (0,0)	3 (9,7)	3 (7,7)	0 (0,0)	3 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
2+	22 (24,2)	21 (67,7)	36 (92,3)	7 (8,4)	12 (80,0)	6 (50,0)	25 (26,3)
3+	69 (75,8)	7 (22,6)	0 (0,0)	76 (91,6)	0 (0,0)	6 (50,0)	70 (73,7)
p	<0,001		<0,001		<0,001		
LC3, n (%)							
1+	0 (0,0)	3 (9,7)	3 (7,7)	0 (0,0)	3 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
2+	17 (18,7)	18 (58,1)	32 (82,1)	3 (3,6)	12 (80,0)	3 (25,0)	20 (21,1)
3+	74 (81,3)	10 (32,2)	4 (10,2)	80 (96,4)	0 (0,0)	9 (75,0)	75 (78,9)
p	<0,001		<0,001		<0,001		
Beclin1, n (%)							
1+	12 (13,2)	3 (9,7)	3 (7,7)	12 (14,5)	3 (20,0)	0 (0,0)	12 (12,6)
2+	49 (53,8)	11 (35,5)	8 (20,5)	52 (62,6)	8 (53,3)	2 (16,7)	50 (52,6)
3+	30 (33,0)	17 (54,8)	28 (71,8)	19 (22,9)	4 (26,7)	10 (83,3)	33 (34,8)
p	<0,001		<0,001		<0,001		

Svi podaci su izraženi kao N (%); OK - Ovarijalni karcinom, HGSC - High grade serozni karcinom, FIGO - Internacionalano udruženje ginekologa i akušera

4.7. Poređenje ekspresije PD-L1 receptora i markera autofagije

4.7.1. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije (p62, LC3, Beclin1) u centralnim delovima ovarijalnih karcinoma

Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom autofagnih markera p62, LC3 i Beclin1 u centralnim delovima ovarijalnih karcinoma je prikazano u **Tabeli 26**. Stepen PD-L1 imunoekspresije značajno se razlikovao u odnosu na ekspresiju p62 i LC3 markera autofagije. Svi OK sa niskim stepenom p62 ekspresije su takođe imali nizak stepen ekspresije PD-L1 markera u centralnom delu karcinoma, dok je čak trećina (26,1%) uzoraka sa visokim stepenom ekspresije p62 u centralnom delu karcinoma imalo nizak stepen ekspresije PD-L1 u istom delu OK ($p=0,020$). Prisutan je isti odnos stepena ekspresije LC3 i PD-L1 markera u centralnim delovima karcinoma ($p=0,020$). Od svih uzoraka centralnih područja OK sa niskim stepenom ekspresije Beclin 1 markera, 73,3% je imalo visok stepen ekspresije PD-L1 markera, dok je od svih centralnih delova OK sa visokim stepenom ekspresije Beclin 1, visok stepen PD-L1 ekspresije imalo 72% uzoraka ($p=0,912$).

Tabela 26. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom autofagnih markera p62, LC3 i Beclin1 u centralnim delovima ovarijalnih karcinoma

Markeri autofagije	Stepen ekspresije	Stepen ekspresije PD-L1 n (%)		p
		1+	≥2+	
p62	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	0,020
	≥2+	31 (26,1)	88 (73,9)	
LC3	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	0,020
	≥2+	31 (26,1)	88 (73,9)	
Beclin1	1+	4 (26,7)	11 (73,3)	0,912
	≥2+	30 (28,0)	77 (72,0)	

4.7.2. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije (p62, LC3, Beclin1) u invazivnim delovima ovarijalnih karcinoma

Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom autofagnih markera p62, LC3 i Beclin1 u invazivnim delovima ovarijalnih karcinoma je prikazana u **Tabeli 27**. Stepen PD-L1 imunoekspresije značajno se razlikovao u invazivnim delovima OK u odnosu na ekspresiju p62 i LC3 autofagnih markera. Od svih OK sa niskim stepenom p62 ekspresije 25% je imalo visok stepen PD-L1 ekspresije, dok su gotovo svi (92,4%) uzorci sa visokim stepenom ekspresije p62 imali i visok stepen ekspresije PD-L1 markera ($p=0,021$). Svi uzorci sa niskim stepenom ekspresije LC3 markera u invazivnim delovima karcinoma su imali takođe nizak stepen ekspresije PD-L1 markera, dok je od svih karcinoma sa visokim stepenom LC3 ekspresije 8,3% bilo sa niskom ekspresijom PD-L1 markera u invazivnim delovima karcinoma ($p=0,002$). Stepen ekspresije Beclin1 se nije značajno razlikovao od stepena ekspresije PD-L1 markera u invazivnim delovima karcinoma ($p=0,815$).

Tabela 27. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom autofagnih markera p62, LC3 i Beclin1 u invazivnim delovima ovarijalnih karcinoma

Markeri autofagije	Stepen ekspresije	Stepen ekspresije PD-L1 n (%)		p
		1+	≥2+	
p62	1+	3 (75,0)	1 (25,0)	0,021
	≥2+	9 (7,6)	109 (92,4)	
LC3	1+	2 (100,0)	0 (0,0)	0,002
	≥2+	10 (8,3)	110 (91,7)	
Beclin1	1+	4 (28,6)	10 (71,4)	0,815
	≥2+	8 (7,4)	100 (92,6)	

4.7.3. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u odnosu na kliničke i patohistološke parametre

Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom autofagnih markera p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od starosti pacijentkinja obolelih od ovarijalnih karcinoma je prikazano u **Tabeli 28**. Stepen ekspresije PD-L1 markera se nije statistički značajno razlikovao u odnosu na stepen ekspresije autofagnih markera p62, LC3 i Beclin1 kod pacijentkinja mlađih od 65 godina, kao ni kod pacijentkinja starih 65 ili više godina.

Tabela 28. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od starosti pacijentkinja

Marker	Stepen ekspresije	Stepen ekspresije PD-L1 u odnosu na starost pacijentkinja n (%)					
		<65 godina			≥65 godina		
		1+	≥2+	p	1+	≥2+	p
p62	1+	2 (100,0)	0 (0,0)	0,098	1 (100,0)	0 (0,0)	0,232
	≥2+	19 (29,7)	45 (70,3)		12 (21,8)	43 (78,2)	
LC3	1+	1 (100,0)	0 (0,0)	0,318	2 (100,0)	0 (0,0)	0,051
	≥2+	20 (30,8)	45 (69,2)		11 (20,4)	43 (79,6)	
Beclin1	1+	2 (33,3)	4 (66,7)	0,933	2 (22,2)	7 (77,8)	0,939
	≥2+	19 (31,7)	41 (68,3)		11 (23,4)	36 (76,6)	

Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom autofagnih markera p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od menopauzalnog statusa pacijentkinja obolelih od ovarijalnih karcinoma je prikazano u **Tabeli 29**. Stepen ekspresije PD-L1 markera se statistički značajno razlikovao jedino u odnosu na LC3 autofagni marker i to kod žena u menopauzi (p=0,017).

Tabela 29. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od menopauzalnog statusa pacijentkinja

Marker	Stepen ekspresije	Stepen ekspresije PD-L1 u odnosu na menopauzalni status n (%)					
		Da			Ne		
		1+	≥2+	p	1+	≥2+	p
p62	1+	2 (100,0)	0 (0,0)	0,068	1 (100,0)	0 (0,0)	0,375
	≥2+	26 (25,0)	78 (75,0)		5 (33,3)	10 (66,7)	
LC3	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	0,017	0 (0,0)	0 (0,0)	/
	≥2+	25 (24,3)	78 (75,7)		6 (37,5)	10 (62,5)	
Beclin1	1+	4 (26,7)	11 (73,3)	0,981	0 (0,0)	0 (0,0)	/
	≥2+	24 (26,4)	67 (73,6)		6 (37,5)	10 (62,5)	

Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom autofagnih markera p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od lateralnosti ovarijalnog karcinoma je prikazano u **Tabeli 30**. Stepenn ekspresije PD-L1 se značajno razlikovao u poređenju sa ekspresijom autofagnih markera p62 i LC3 kod bilateralnih ovarijalnih karcinoma.

Tabela 30. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od lateralnosti ovarijalnih karcinoma

Marker	Stepen ekspresije	Stepen ekspresije PD-L1 u odnosu na lateralnost karcinoma n (%)					
		Unilateralna			Bilateralna		
		1+	≥2+	p	1+	≥2+	p
p62	1+	1 (100,0)	0 (0,0)	1,000	2 (100,0)	0 (0,0)	0,027
	≥2+	19 (48,7)	20 (51,3)		12 (15,0)	68 (85,0)	
LC3	1+	1 (100,0)	0 (0,0)	1,000	2 (100,0)	0 (0,0)	0,027
	≥2+	19 (48,7)	20 (51,3)		12 (15,0)	68 (85,0)	
Beclin1	1+	1 (16,7)	5 (83,3)	0,077	3 (33,3)	6 (66,7)	0,169
	≥2+	19 (55,9)	15 (44,1)		11 (15,1)	62 (84,9)	

Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom autofagnih markera p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od maksimalnog promera ovarijalnih karcinoma je prikazano u **Tabeli 31**. Stepen ekspresije PD-L1 markera se značajno razlikovao u poređenju sa ekspresijom autofagnih markera p62 i LC3 kod velikih tumora (≥ 80 mm).

Tabela 31. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od maksimalnog promera ovarijalnih karcinoma

Marker	Stepen ekspresije	Stepen ekspresije PD-L1 u odnosu na maksimalni promer n (%)					
		<80mm			≥ 80 mm		
		1+	$\geq 2+$	p	1+	$\geq 2+$	p
p62	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/	3 (100,0)	0 (0,0)	0,026
	$\geq 2+$	14 (24,6)	43 (75,4)		17 (27,4)	45 (72,6)	
LC3	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/	3 (100,0)	0 (0,0)	0,026
	$\geq 2+$	14 (24,6)	43 (75,4)		17 (27,4)	45 (72,6)	
Beclin1	1+	1 (14,3)	6 (85,7)	0,500	3 (37,5)	5 (62,5)	0,660
	$\geq 2+$	13 (26,0)	37 (74,0)		17 (29,8)	40 (70,2)	

Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od histološkog tipa ovarijalnih karcinoma je prikazano u **Tabeli 32**. Stepen PD-L1 ekspresije se nije statistički značajno razlikovala od stepena ekspresije markera autofagije u svim histološkim tipovima ovarijalnih karcinoma.

Tabela 32. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od histološkog tipa ovarijalnih karcinoma

Histološki tip	Marker	Stepen ekspresije	Stepen ekspresije PD-L1 n (%)		p
			1+	≥2+	
Serozni	p62	1+	2 (100,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	5 (62,5)	3 (37,5)	
	LC3	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	4 (57,1)	3 (42,9)	
	Beclin1	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	0,270
		≥2+	4 (57,1)	3 (42,9)	
Mucinozni	p62	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	1,000
		≥2+	21 (20,4)	82 (79,6)	
	LC3	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	0,475
		≥2+	21 (20,4)	82 (79,6)	
	Beclin1	1+	1 (8,3)	11 (91,7)	0,475
		≥2+	20 (22,0)	71 (78,0)	
Endometrioidni	p62	1+	1 (100,0)	0 (0,0)	1,000
		≥2+	5 (62,5)	3 (37,5)	
	LC3	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	6 (66,7)	3 (33,3)	
	Beclin1	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	6 (66,7)	3 (33,3)	

Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom autofagnih markera p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od histološkog podtipa seroznih ovarijalnih karcinoma je prikazano u **Tabeli 33**. Nije utvrđena statistički značajna razlika u stepenu ekspresije između PD-L1 markera i markera autofagije u odnosu na histološke podtipove seroznih ovarijalnih karcinoma.

Tabela 33. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od histološkog podtipa seroznih ovarijalnih karcinoma

Marker	Stepen ekspresije	Stepen ekspresije PD-L1 u seroznim karcinomima ovarijuma n (%)					
		HGSC			LGSC		
		1+	≥2+	p	1+	≥2+	p
p62	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/	0 (0,0)	0 (0,0)	/
	≥2+	15 (16,5)	76 (83,5)		6 (50,0)	6 (50,0)	
LC3	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/	0 (0,0)	0 (0,0)	/
	≥2+	15 (16,5)	76 (83,5)		6 (50,0)	6 (50,0)	
Beclin1	1+	1 (8,3)	11 (91,7)	0,414	0 (0,0)	0 (0,0)	/
	≥2+	14 (17,7)	65 (82,3)		6 (50,0)	6 (50,0)	

HGSC - High grade serozni karcinom, LGSC - Low grade serozni karcinom

Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od FIGO stadijuma ovarijalnih karcinoma je prikazano u **Tabeli 34**. Stepenn ekspresije PD-L1 markera u odnosu na ekspresiju autofagnih markera p62, LC3 i Beclin1 se nije značajno razlikovala u zavisnosti od FIGO stadijuma bolesti.

Tabela 34. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u odnosu na FIGO stadijume ovarijalnih karcinoma

FIGO stadijum	Marker	Stepenn ekspresije	Stepenn ekspresije PD-L1 n (%)		p
			1+	≥2+	
FIGO I	p62	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	1,000
		≥2+	20 (83,3)	4 (16,7)	
	LC3	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	1,000
		≥2+	20 (83,3)	4 (16,7)	
	Beclin1	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	1,000
		≥2+	20 (83,3)	4 (16,7)	
FIGO II	p62	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	7 (58,3)	5 (41,7)	
	LC3	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	7 (58,3)	5 (41,7)	
	Beclin1	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	7 (58,3)	5 (41,7)	
FIGO III	p62	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	4 (4,9)	78 (95,1)	
	LC3	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	4 (4,9)	78 (95,1)	
	Beclin1	1+	1 (9,1)	10 (90,9)	0,444
		≥2+	3 (4,2)	68 (95,8)	

Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom autofagnih markera p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od gradusa ovarijalnih karcinoma je prikazano u **Tabeli 35**. Stepenn ekspresije PD-L1 markera nije pokazala statistički značajnu razliku u odnosu na Beclin1 marker autofagije sa kojima je poređenje jedino bilo moguće (p=0,449).

Tabela 35. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od gradusa ovarijalnih karcinoma

Histološki gradusi tumora	Marker	Stepen ekspresije	Stepen ekspresije PD-L1		p
			n (%)		
			1+	≥2+	
Gradus I	p62	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	12 (100,0)	0 (0,0)	
	LC3	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	12 (100,0)	0 (0,0)	
	Beclin1	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	12 (100,0)	0 (0,0)	
Gradus II	p62	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	4 (33,3)	8 (66,7)	
	LC3	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	4 (33,3)	8 (66,7)	
	Beclin1	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	4 (33,3)	8 (66,7)	
Gradus III	p62	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	15 (15,8)	80 (84,2)	
	LC3	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	15 (15,8)	80 (84,2)	
	Beclin1	1+	1 (8,3)	11 (91,7)	0,449
		≥2+	14 (16,9)	69 (83,1)	

Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od prisustva nekroze, limfovaskularne invazije, intratumorske i peritumorske limfocitne infiltracije ovarijalnih karcinoma je prikazano u **Tabeli 36**. Ekspresija PD-L1 markera se nije statistički značajno razlikovala od stepena ekspresije markera autofagije p62, LC3 i Beclin1 bez obzira na prisustvo/odsustvo ispitivanih histopatoloških karakteristika ovarijalnih karcinoma (nekroza, limfovaskularna invazija, intratumorska i peritumorska limfocitna infiltracija).

Tabela 36. Poređenje PD-L1 ekspresije sa ekspresijom markera p62, LC3 i Beclin1 u zavisnosti od prisustva nekroze, limfovaskularne invazije i tipa limfocitnog infiltrata

Nekroza	Marker	Stepen ekspresije	Stepen ekspresije PD-L1 n (%)		p
			1+	≥2+	
Da	p62	1+	1 (100,0)	0 (0,0)	0,196
		≥2+	18 (18,8)	78 (81,3)	
	LC3	1+	1 (100,0)	0 (0,0)	0,196
		≥2+	18 (18,8)	78 (81,3)	
	Beclin1	1+	2 (18,2)	9 (81,8)	0,901
		≥2+	17 (19,8)	69 (80,2)	
Ne	p62	1+	2 (100,0)	0 (0,0)	0,229
		≥2+	13 (56,5)	10 (43,5)	
	LC3	1+	2 (100,0)	0 (0,0)	0,229
		≥2+	13 (56,5)	10 (43,5)	
	Beclin1	1+	2 (50,0)	2 (50,0)	0,656
		≥2+	13 (61,9)	8 (38,1)	
Limfo-vaskularna invazija					
Da	p62	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	18 (17,5)	85 (82,5)	
	LC3	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	18 (17,5)	85 (82,5)	
	Beclin1	1+	1 (8,3)	11 (91,7)	0,375
		≥2+	17 (18,7)	74 (81,3)	
Ne	p62	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	1,000
		≥2+	13 (81,3)	3 (18,8)	
	LC3	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	1,000
		≥2+	13 (81,3)	3 (18,8)	
	Beclin1	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	1,000
		≥2+	13 (81,3)	3 (18,8)	
Intratumorska limfocitna infiltracija					
Da	p62	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	20 (20,2)	79 (79,8)	
	LC3	1+	0 (0,0)	0 (0,0)	/
		≥2+	20 (20,2)	79 (79,8)	
	Beclin1	1+	1 (10,0)	9 (90,0)	0,397
		≥2+	19 (21,3)	70 (78,7)	
nastavak tabele na sledećoj strani					

nastavak tabele					
Ne	p62	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	0,136
		≥2+	11 (55,0)	9 (45,0)	
	LC3	1+	3 (100,0)	0 (0,0)	0,136
		≥2+	11 (55,0)	9 (45,0)	
	Beclin1	1+	3 (60,0)	2 (40,0)	0,964
		≥2+	11 (61,1)	7 (38,9)	
Peritumorska limfocitna infiltracija					
Da	p62	1+	1 (100,0)	0 (0,0)	0,245
		≥2+	26 (23,9)	83 (76,1)	
	LC3	1+	1 (100,0)	0 (0,0)	0,245
		≥2+	26 (23,9)	83 (76,1)	
	Beclin1	1+	2 (16,7)	10 (83,3)	0,502
		≥2+	25 (25,5)	73 (74,5)	
Ne	p62	1+	2 (100,0)	0 (0,0)	0,470
		≥2+	5 (50,0)	5 (50,0)	
	LC3	1+	2 (100,0)	0 (0,0)	0,470
		≥2+	5 (50,0)	5 (50,0)	
	Beclin1	1+	2 (66,7)	1 (33,3)	0,735
		≥2+	5 (55,6)	4 (44,4)	

5. DISKUSIJA

Karcinom jajnika je vrlo agresivan neoplastični proces. Lečenje karcinoma jajnika se vrlo često završava pojavom recidiva bolesti i rezistencije na postojeće hemioterapijske protokole. Oko 25% žena pokazuje primarnu terapijsku rezistenciju na platinske citostatike (116). Jedna od ideja prevazilaženja terapijske rezistencije i boljeg ishoda lečenja pacijentkinja obolelih od ovarijalnog karcinoma je udružena primena različitih terapijskih modaliteta. U ovoj studiji analizira se povezanost imunosupresivnih tumorskih mehanizama sa procesom autofagije u cilju boljeg razumevanja njihovog značaja i promocije antitumorske terapije.

Naše istraživanje obuhvatilo je epitelne tumore jajnika različitog biološkog ponašanja od čega su 122 pacijentkinje imale karcinome. U odnosu na atipično proliferišuće tumore i benigne tumore jajnika koji su činili kontrolnu grupu, one su bile najstarije, u menopauzi. Serozni histološki tip ovarijalnog karcinoma tj. 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 malignošću tumora. Maligni tumori jajnika su značajno češće bilateralni.

Stepen histološke diferencijacije tumora (gradus) ima značajnu ulogu u prognozi pacijentkinja obolelih od ovarijalnog karcinoma. Opsežne retrospektivne, multivarijantne analize rađene na 1545 pacijenata sa ranim stadijumom FIGO I ovarijalnog karcinoma, pokazale su da je stepen histološke diferencijacije tumora najznačajniji prognostički indikator preživljavanja bez bolesti *Disease-Free Survival* (DFS) (117). Neke od kasnijih studija (Kanadska studija, studija Ginekološko Onkološke grupe) međutim pokazuju da histološki gradus ne može biti nezavistan prognostički faktor (118).

Pored stadijuma tumorske bolesti i histološkog gradusa bitnu ulogu u prognostičkom smislu imaju i starost pacijentkinje kao i reproduktivna dob. Incidencija ovarijalnog karcinoma raste sa starosnom dobi. U Sjedinjenim Američkim Državama, godišnja incidencija je oko 3 bolesnice na 100,000 za mlađe od 30 godina, dok za starosno doba 75-79 godina incidencija raste na oko 54 na 100,000 pacijentkinja (119). Porodična anamneza pacijentkinje o prisutnom karcinomu dojke ili ovarijuma, može dovesti do pojave karcinoma u ranijim godinama. U tim slučajevima uglavnom postoji nasledni oblik mutacije u genima BRCA1 i BRCA2 koji su bitni regulatori mehanizma popravke DNK (120).

U našem istraživanju pokazali smo značajno češću ekspresiju PD-L1 receptora u ovarijalnim karcinomima u odnosu na APT i benigne tumore jajnika. Ovarijalni karcinomi su imunogeni tumori, kod kojih je uočena aktivacija imunosupresivnih antitumorskih mehanizama tipa PD-1/PD-L1. Karcinomi koji utiču na regulaciju ekspresije PD-L1 receptora mogu biti osetljivi na primenu ciljane, imunomodulatorne terapije. Efikasnost imunoterapije zasnovana je na proceni ekspresije ciljanih molekula čija se aktivnost može regulisati različitim terapijskim agensima. PD-L1 receptor je jedan od molekula čija se funkcija aktuelno istražuje, posebno u odnosu na druge molekule i regulatorne faktore u tumorskom mikrokruženju (112, 121, 122). 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 (27, 112, 122). 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.

Nemačko udruženje patologa je jedna od organizacija koja radi na definisanju standardizovanih graničnih vrednosti. Skorašnja studija koja ispituje primenu leka Pembrozilumab u lečenju nesitnoćelijskog karcinoma pluća, prva je ukazala na značajnost ekspresije u više od 50% tumorskih ćelija kao povoljnog prognostičkog parametra, uz napomenu da su postojali ispitanici sa povoljnijim ishodom bolesti i sa nižim stepenom ekspresije (123).

Ekspresija površinskog PD-L1 receptora je dinamičan i kontinuiran proces tokom koga se PD-L1 molekul intracelularno reciklira i ponovo eksprimira na membrani ćelije. Različiti faktori mogu poremetiti ovaj proces, pre svega način fiksiranja prilikom histološke obrade tkiva i procesi imunohistohemijske analize uzoraka. Dokazano je da su vrsta fiksativa i dužina trajanja fiksacije bitni faktori koji određuju način ekspresije PD-L1 markera. Primena hemioterapije takođe može izmeniti karaktersitike PD-L1 ekspresije (124).

Različiti tipovi karcinoma imaju specifične karakteristike PD-L1 ekspresije. Karcinom jednjaka pokazuje membransku, citoplazmatsku i nuklearnu ekspresiju, pri čemu je nuklearna pozitivnost povezana sa stepenom tumorske invazivnosti. Izolovane tumorske ćelije iz krvi pacijenata obolelih od osteosarkoma, karcinoma debelog creva, prostate ili dojke pokazuju nuklearnu ekspresiju PD-L1 markera koja je povezana sa nepovoljnim ishodom bolesti (124). Prisutna je razlika PD-L1 ekspresije diferentovanih u odnosu na matične karcinomske ćelije. U matičnim karcinomskim ćelijama površinski PD-L1 receptor nije adekvatno vezan za intracelularni, submembranski citoskelet, što dovodi do neadekvatne fiksacije tkivnog uzorka i nepravilnosti u imunohistohemijskom bojenju (124).

Obrazac ekspresije PD-L1 antitela može biti uslovljen različitim ekstracelularnim imunološkim procesima u tumorskom okruženju. Tumor udruženi makrofagi (TAM) sekretuju inflamatorne citokine koji indukuju membransku ekspresiju PD-L1 na tumorskim ćelijama ovarijalnog karcinoma. Intenzitet membranske ekspresije PD-L1 je u pozitivnoj korelaciji sa prisustvom TAM u mikrookruženju tumora. U neposrednoj okolini detektovana je i veća koncentracija CD8⁺ citotoksičnih T-limfocita sa eksprimiranim PD-1 molekulom na površini (110). Prisutna je negativna korelacija tumorske ekspresije PD-L1 markera i prisustva NK ćelija u tkivu karcinoma jajnika i serumu pacijentkinja. NK ćelije su bitan deo primarnog antitumorskog imunološkog odgovora koje svoju funkciju ostvaruju putem hemokina CCL5 i CXCL1. Predstavljaju bitnu ćelijsku populaciju prilikom razmatranja primene NK ćelijske imunomodulatorne terapije kod pacijentkinja sa odsutnom PD-L1 ekspresijom u ovarijalnom karcinomu (125, 126).

PD-1/PD-L1 molekuli su do sada najbolje proučeni imunološki proteini koji imaju značajan uticaj na proliferaciju tumorskih ćelija i na primenu imunološke antitumorske terapije. Vezivanjem PD-L1 liganda na tumorskim ćelijama za PD-1 receptor na T-limfocitima pokreću se imunosupresivni procesi koji dovode do inhibicije imunološkog antitumorskog odgovora. Dolazi do suprimiranja sekrecije citokina i citotoksičnih supstanci koje aktivirani T-limfociti sekretuju u sklopu imunološke odbrane (110, 127). Istraživanja pokazuju da takva funkcija PD-L1 liganda ukazuje na veću agresivnost tumora. Detekcija PD-L1 proteina u serumu pacijenata ili procena imunohistohemijske ekspresije na tkivu tumora, mogla bi se koristiti kao značajan dijagnostički i prognostički marker. Nivo PD-L1 proteina u serumu pacijentkinja obolelih od karcinoma jajnika značajno je povišen u odnosu na pacijentkinje sa benignim i *borderline* ovarijalnim tumorima (128, 129). Solubilni, serumski PD-L1 protein stvaraju i aktivirane, zrele dendritične ćelije. Kontakt CD4⁺ i CD8⁺

T-limfocita sa solubilnim PD-L1 molekulom prezentovanim na antigen prezentujućoj dendritičnoj ćeliji, dovodi do njihove apoptoze. S obzirom da pored tumorskih i imunološke ćelije mogu stvarati solubilne PD-L1 molekule, pretpostavlja se da je za efektivnije terapijske odgovore potrebno inhibirati i PD-L1 proteine stvorene od imunoloških ćelija (130).

PD-L1 marker se eksprimira na tumorskim ćelijama različitih primarnih lokalizacija: cerviks, pluća, koža. Karakteristike njegove ekspresije predstavljaju temu različitih istraživanja u cilju preciznijeg definisanja uloge PD-1/PD-L1 imunosupresivnog mehanizma (131). Studije pokazuju udruženost intenzivnije ekspresije PD-L1 markera sa lošijom prognozom bolesti kod karcinoma pluća, mokraćne bešike, jetre, debelog creva. Ekspresija markera PD-L1 na različitim tumorskim ćelijama korelira sa uspehom primenjene terapije (132-136).

Tumorske ćelije u metastazama pokazuju drugačiji stepen ekspresije PD-L1 markera u odnosu na one iz primarnog tumora. Kod pacijentkinja sa povratkom bolesti, PD-L1 ekspresija na tumorskim ćelijama seroznog karcinoma jajnika je intenzivnija u tumorskom recidivu u odnosu na primarni tumor. Takvi rezultati opravdavaju primenu PD-L1 inhibitora pre svega kod uznapredovalih i recidivirajućih tumora (126).

U cilju sveobuhvatnijeg istraživanja značaja imunoloških „*checkpoint*“ mehanizama na ćelijama karcinoma, pojedine studije ispituju ekspresiju i regulaciju imunoloških molekula na T-limfocitima izolovanim iz sadržaja peritonealne lavaže pacijentkinja obolelih od karcinoma jajnika. Na taj način se može preciznije definisati uticaj tumorskog mikrokruženja. Dokazana je ushodna regulacija ekspresije PD-1 receptora na T-limfocitima koji su u okolini karcinomskih ovarijalnih ćelija. T-limfociti takođe eksprimiraju brojne druge imunološke regulatorne mehanizme koji se manje eksprimiraju u odnosu na PD-1 receptor, ali svakako sa jednako važnom funkcijom u regulaciji antitumorskog imunološkog odgovora. Neki od značajnijih kontrolnih punktova su: LAG-3 (*Lymphocyte activation gene 3*), TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*), BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*). Pronalaženje adekvatnih inhibitora većeg broja navedenih imunoloških signalnih puteva unapredilo bi lečenje karcinoma (36, 137).

Serozni histološki tip ovarijalnih karcinoma u ovom istraživanju pokazuje značajno češću 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 najčešće u HGSC tipu tumora. PD-L1 marker ima heterogenu ekspresiju u različitim histološkim tipovima ovarijalnog karcinoma (25, 50). Dokazano je da su PD-1 i PD-L1 molekuli bitni regulatorni imunološki proteini sa značajnom prognostičkom ulogom kod HGSC tipa (27). Pojedini autori opisuju značajnu razliku u PD-L1 ekspresiji između nisko gradusnih (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 (27, 138, 139). HGSC su podeljeni u četiri kategorije na osnovu genetskih karakteristika RNK molekula: imunoreaktivni, diferentovani, proliferativni i mezenhimalni. Imunoreaktivni tip karakteriše ekspresija gena za ligande hemokina CXCL10 i CXCL11 na T-limfocitima, kao i ekspresija gena receptora CXCR3. Diferentovan tip je povezan sa genima koji utiču na sazrevanje tumorskih ćelija. Proliferativni tip određuju brojni proliferativni faktori, dok je mezenhimalni okarakterisan genima sa uticajem na obilnije stvaranje okolne strome. Istraživanje uticaja ovako definisanih kategorija HGSC na

preživljavanje pokazuje da je imunoreaktivni tip najbolji prediktor preživljavanja, ukazujući da je lokalni peritumorski imunološki odgovor kod ovarijalnog karcinoma u značajnoj povezanosti sa ishodom preživljavanja ovih pacijentkinja (140).

Pojedine studije opisuju odsustvo ekspresije PD-L1 markera na tumorskim ćelijama seroznog ovarijalnog karcinoma, često udruženo sa nižom ekspresijom MHC I molekula na antigen prezentujućim ćelijama. Tumorske ćelije pribegavaju nishodnoj regulaciji ekspresije MHC I molekula u cilju izbegavanja prezentacije tumorskih antigena imunološkom sistemu. Dodatno odsustvo PD-L1 ekspresije na tumorskim ćelijama dovodi do još efikasnijeg izbegavanja antitumorskog imunološkog odgovora. Ushodna regulacija faktora TGF- β , IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*), COX-1 i 2 (*cyclooxygenases 1, 2*) udruženo pomaže u ostvarivanju imunosupresije (50, 126, 140).

Dokazana je udruženost visoke PD-L1 ekspresije sa histološkim parametrima koji ukazuju na veću agresivnost karcinoma (nekroza, limfovaskularna tumorska invazija, limfocitni infiltrat). Od posebnog je značaja 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 sugeriše veći metastatski potencijal tumorskih ćelija (141).

U ovoj studiji ispitivane su razlike u ekspresiji PD-L1 markera između centralnih i invazivnih delova ovarijalnih karcinoma. Pokazana je statistički značajno češća PD-L1 ekspresija u invazivnim delovima karcinoma. Izdvaja se jaka kategorija PD-L1 ekspresije čija je učestalost veća u invazivnim delovima i koja najviše doprinosi većoj zastupljenosti visoke PD-L1 ekspresije, značajne u prognostičkom i terapijskom smislu (50). HGSC histološki tip ovarijalnih karcinoma pokazuje značajno viši stepen PD-L1 ekspresije u invazivnim delovima karcinoma, ukazujući na izraženiju aktivnost PD-1/PD-L1 mehanizma u najagresivnijim delovima karcinoma. Ostali histološki tipovi ovarijalnih karcinoma nisu pokazali značajne razlike PD-L1 ekspresije između različitih delova tumora. Njihova manja zastupljenost u odnosu na HGSC histološki tip bi mogao biti jedan od razloga takvih rezultata. Poređenjem udruženosti PD-L1 ekspresije sa FIGO stadijumom u centralnom i invazivnom delu tumora uočavamo zastupljeniju visoku PD-L1 ekspresiju u FIGO IC stadijumu invazivnog dela tumora u odnosu na centralni. U višim FIGO stadijumima prisutna je još učestalija PD-L1 ekspresija u invazivnim delovima, pretežno kod svih pacijentkinja, ukazujući na povezanost izraženije PD-L1 ekspresije sa agresivnijim histološkim parametrima. Analiza ekspresije PD-L1 markera u različitim segmentima ovarijalnih karcinoma nije dovoljno zastupljena u literaturi.

Istraživanja pokazuju značajnu povezanost ekspresije PD-L1 markera sa zastupljenošću peritumorskog limfocitnog infiltrata. Pokazano je da izraženo prisustvo TIL-a korelira sa visokom ekspresijom PD-L1 u različitim histološkim tipovima ovarijalnog karcinoma. Ekspresija PD-L1 na karcinomskim ćelijama jajnika može biti indukovana INF- γ iz aktiviranih T-limfocita u okruženju (50, 142). Stepen ekspresije PD-L1 markera na tumorskim ćelijama i zastupljenost TIL-a su nezavisni prognostički parametri u lečenju pacijentkinja sa ovarijalnim karcinomom (112, 143). Visoka koncentracija CD8+ TIL-a je povezana sa PD-L1 ekspresijom na tumorskim ćelijama predominantno na mestima najveće invazivnosti tumora. PD-L1 ekspresija na karcinomskim ćelijama HGSC je u negativnoj korelaciji sa preživaljavanjem obolelih, za razliku od visokih koncentracija CD3+ i CD8+ TIL-a koji ukazuju na povoljne ishode (144).

Prilikom poređenja PD-L1 ekspresije u različitim delovima karcinoma 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. 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 (27). Intratumorski TIL su opisani kao najznačajniji prognostički faktor koji određuje biološko ponašanje ovarijalnih karcinoma (122). Takođe su prisutne studije koje pokazuju negativnu korelaciju između PD-L1 ekspresije na karcinotskim ćelijama jajnika i intratumorskog limfocitnog infiltrata. Takvi rezultati se mogu objasniti prisustvom inhibicije antitumorskog imunološkog odgovora pod uticajem PD-L1 molekula na tumorskim ćelijama. Faktori kao što su veličina ispitivanog uzorka, različiti metodološki pristupi u istraživanjima i drugačiji odabir tipova antitela, svakako mogu uticati na oprečne rezultate među studijama (143, 145). Ekspresija PD-L1 i PD-1 molekula se osim na tumorskim ćelijama ispoljava na imunološkim ćelijama u tumorskom mikrokruženju. Udružena analiza ekspresije ovih molekula na tumorskim ćelijama bi mogla preciznije definisati antitumorske imunosupresivne mehanizme. Dokazana je udruženost PD-L1 ekspresije na makrofagima u okolini HGSC tipa sa značajno boljim preživljavanjem ovih pacijentkinja (146). Skorašnje studije su istraživale razlike u ekspresiji većeg broja markera uključenih u imunološku antitumorsku odbranu, na različitim tipovima ćelija. PD-L1, PD-1 i CD8 molekuli su ispitivani na TIL-u dok je ekspresija PD-L1 analizirana na ovarijalnim karcinotskim ćelijama. Dodatno su analizirane razlike obrazaca ekspresije između ćelija primarnih karcinoma jajnika i karcinotskih ćelija u peritonealnim metastazama (147). Od svih poređenja, značajna povezanost uočena je kod PD-L1 ekspresije na karcinotskim ovarijalnim ćelijama između primarnih i metastatskih lokalizacija. Markeri ekspimirani na TIL ćelijskoj populaciji pokazali su značajne razlike u ekspresijama u odnosu na različite lokalizacije karcinotskih ćelija. Visoka PD-L1 ekspresija na TIL-u povezana je sa lošijim ishodom bolesti (147). Ovakvi rezultati bi se mogli objasniti inicijacijom intratumorske imunološke tolerancije koja je posledica imunosupresivne aktivnosti PD-L1 molekula ekspimiranih na TIL-u prema T-limfocitima u neposrednoj okolini koji na svojoj površini ispoljavaju PD-1 molekul (148). Nasuprot tome pojedini autori pokazuju da je viša PD-L1 ekspresija na TIL-u protektivni faktor pacijentkinja sa ovarijalnim karcinomom. TIL sa ekspimiranim PD-L1 receptorom mogu aktivirati citotoksične CD8+ limfocite i stimulisati antitumorski imunološki odgovor (149). Antigen prezentujuće ćelije takođe mogu ekspimirati PD-L1 receptor sa značajnom funkcijom na primenu imunoterapije. Dokazana je efikasnost terapije inhibitorima PD-1/PD-L1 mehanizma kod pacijenata sa slabom ili odsutnom PD-L1 ekspresijom na karcinotskim ćelijama. Smatra se da je za takav efekat odgovorna očuvana PD-L1 ekspresija na antigen prezentujućim ćelijama. Istovremena ekspresija PD-L1 receptora na tumorskim i na antigen prezentujućim ćelijama indukovana je citokinom INF- γ . U tumorskom mikrokruženju karcinoma jajnika identifikovane su tri populacije dendritičnih antigen prezentujućih ćelija sa specifičnim površinskim molekulima. CD103+ dendritične ćelije mogu stimulisati efektorne T-limfocite u tumorskom mikrokruženju čak i kod uznapredovalih stadijuma ovarijalnog karcinoma. Druga vrsta dendritičnih ćelija je sposobna da indukuje ekspresiju PD-L1 receptora u tumorskom mikrokruženju ushodnom regulacijom Liar-1 koinhibitornog receptora, dovodeći do imunosupresivnih efekata. Pojedine dendritične ćelije iz tumorskog mikrokruženja su nezrele, sa nedovoljnom kostimulatornom funkcijom i poremećenom funkcijom prezentacije antigena dovodeći do neadekvatne stimulacije T-limfocita. S obzirom na ovako heterogeno

ponašanje ekspresije PD-L1 markera, sugeriraju se udruženo tumačenje PD-L1 ekspresije na tumorskim ćelijama ovarijalnog karcinoma u korelaciji sa ekspresijom na imunološkim ćelijama tumorskog mikrookruženja. Pretpostavlja se da bi takvim obuhvatnijim razmatranjem PD-L1 ekspresije, uz individualizovan terapijski pristup pacijentkinjama, primena inhibitora PD-L1 receptora imala efikasniji terapijski učinak (125, 150).

Naša studija ukazuje na značaj tumorskog mikrookruženja i antitumorskog imunološkog odgovora koji je značajno aktiviran kod agresivnijih histoloških tipova ovarijalnih karcinoma kao što je HGSC i to u višim FIGO stadijumima. Dostupni su rezultati o pozitivnoj korelaciji između PD-L1 ekspresije na ćelijama ovarijalnog karcinoma i prisutnim značajnim TIL-om, ali nema dovoljno studija koje uključuju značaj lokalizacije limfocitnog infiltrata u odnosu na PD-L1 ekspresiju u različitim tumorskim segmentima i različitim histološkim tipovima ovarijalnih karcinoma. Dobijeni rezultati mogu ukazati na mogućnost efikasne primene PD-L1 inhibitora kod agresivnijih histoloških tipova ovarijalnih karcinoma (HGSC), posebno sa prisutnim intratumorskim limfocitnim infiltratom.

Nažalost kod uznapredovale maligne bolesti, kada je TIL slabo izražen, ne može se pokrenuti adekvatan peritumorski imunološki odgovor kao rezultat velike opterećenosti količinom tumorskog tkiva (tumor burden) (25). Značajno je otkriće efektorske, memorijske funkcije TIL-a, kao i njena povezanost sa povoljnom prognozom u mnogim karcinomima, ukazujući na postojanje dugotrajnog antitumorskog imuniteta. Cirkulišući efektorski, memorijski T-limfociti kontrolišu pojavu recidiva bolesti (29). B-limfociti takođe učestvuju u stvaranju populacije TIL-a. Njihova značajna funkcija je prezentacija tumorskih antigena CD8+ T-limfocitima. Veće prisustvo B-limfocita i stimuliranih CD8+ T-limfocita primećeno je u metastazama ovarijalnog karcinoma što je u korelaciji sa dužim preživljavanjem pacijentkinja u odnosu na tumore bez udruženih B-limfocita (29).

Tumorsko mikrookruženje je sastavljeno od heterogenih imunoloških ćelijskih populacija, fibroblasta, endotelinih i nervnih ćelija. Uticaj mikrookruženja tumora je značajan za njegov opstanak i progresiju. Aktuelno se ispituje značaj okoline tumora u odnosu na imunološki antitumorski odgovor. Svako tkivo ima specifične karakteristike lokalnog imuniteta koje određuju posebnosti tumorskog mikrookruženja tumora tog tkiva tj. organa. Imunološke ćelije čine najveći deo tumorskog mikrookruženja, predstavljene uglavnom T-limfocitima, monocitima i makrofagima koji su lokalizovani predominantno u peritumorskoj stromi na mestu najintenzivnije invazije tumora. Vrsta imunoloških ćelija u mikrookruženju određuje terapijski učinak u odnosu na dosadašnju poznatu imunoterapiju. Tumori mozga imaju nisku zastupljenost peritumorskih imunoloških ćelija pretežno sačinjenih od makrofaga, što objašnjava njihovo ograničeno reagovanje na imunološke inhibitore. Nasuprot tome okolina nesitnoćelijskih karcinoma pluća bogata je T-limfocitima koji su odgovorni za već standardizovanu terapiju PD-L1 inhibitora u lečenju ovih pacijenata (125, 151).

Produkti katabolizma aminokiseline triptofana unutar tumorskog mikrookruženja imaju značajan immunosupresivan uticaj. Katabolizam triptofana regulisan je enzimom *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO) koji se produkuje u MDS i karcinomske ćelijama. Kinurenin je produkt katabolizma sa immunosupresivnom funkcijom koju ostvaruje inhibiranjem proliferacije efektornih T-limfocita, kao i indukovanjem njihove apoptoze i anergije. Inhibiranjem ovih enzimskih procesa omogućila bi se adekvatna efikasnost TIL-a u antitumorskom imunološkom odgovoru. Dendritične ćelije u tumorskom mikrookruženju lučenjem interferona tip I (INF I) utiču na veću zastupljenost TIL-a i posredno značajniju efikasnost imunoterapije (33).

S obzirom na složenost i dinamičnost mehanizma autofagije, potrebno je ispitati više od jednog molekula koji reguliše ovaj proces. U ovoj studiji smo analizirali ekspresiju p62, LC3 i Beclin1 autofagnih markera u epitelnim ovarijalnim tumorima različitog biološkog ponašanja. Ova tri markera autofagije su do sada najčešće ispitivani zbog njihovog zadovoljavajućeg prediktivnog potencijala u smislu verodostojnog uvida u dinamiku procesa autofagije tumorskih ćelija (66). Unutar procesa autofagije svaki od markera ima svoje specifične funkcije koje su međusobno komplementarne i teže zadaničkom cilju a to je adekvatna regulacija mehanizma. Proteini uključeni u regulaciju autofagije često imaju i druge bitne ćelijske funkcije kao što su: apoptoza, regulacija intracelularnog transporta molekula i intracelularnih signalnih puteva, regulacija transkripcije, translacije. Ispitivanje uloge i ekspresije pridruženih molekula u regulaciji autofagije takođe može doprineti preciznijem definisanju ključnih regulatornih proteina (66, 152).

Kategorije ekspresije p62, LC3 i Beclin1 markera koreliraju sa stepenom maligniteta epitelnih ovarijalnih tumora. Pokazana je značajno viša ekspresija sva tri analizirana markera u ovarijalnim karcinomima, u odnosu na APT i posebno benigne tumore, što je slično rezultatima drugih studija (153, 154). Istraživanja pokazuju udruženost niskog stepena p62 ekspresije sa agresivnijim tokom bolesti ovarijalnih karcinoma. Slaba p62 ekspresija povezana je sa čestom pojavom recidiva, metastaza i terapijske rezistencije (102). Pojedine studije opisuju visoku citoplazmatsku i nisku nuklearnu ekspresiju p62 markera kod ovarijalnih karcinoma agresivnijeg kliničkog toka i lošije prognoze bolesti, što je slično našim rezultatima (66, 155). Pretpostavka je da bi se udruženom primenom i korelacijom dva ili više markera procesa autofagije, određeni nedostaci zadovoljavajuće korigovali (66, 77, 155, 156). Analizom različitih tipova karcinoma pokazana je udruženost značajne ekspresije LC3 markera i veće agresivnosti tumora, što je u skladu sa našim podacima (64, 66, 103). Dokazano je da je visoka ekspresija LC3B antitela u pozitivnoj korelaciji sa lošim ishodom bolesti kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke, sa različitim obrascima ekspresije u odnosu na histološke podtipove. Visoka ekspresija LC3A (subjedinica A) markera je povezana sa lošim terapijskim odgovorom na platinsku hemioterapiju u lečenju pacijentkinja obolelih od svetloćelijskog karcinoma jajnika. Dileme postoje oko načina tumačenja ekspresije ovog antitela, tj. izbora najreprezentativnijeg ćelijskog kompartmenta, pri čemu se prednost daje citoplazmatskom načinu ekspresije (66, 96, 103, 157). Protein Beclin1 je u negativnoj korelaciji sa ekspresijom Bcl-2 molekula. S obzirom da je Beclin1 protein u interakciji sa antiapoptotskim molekulima, gubitak njegove ekspresije bi mogao biti povezan sa lošijom prognozom bolesti kao posledicom stimulacije antiapoptotskih intracelularnih signalnih puteva u karcinomskim ćelijama (104, 158, 159). Heterogena ekspresija Beclin1 markera u našim ovarijalnim karcinomima bi se mogla objasniti dodatnim funkcijama koje Beclin1 molekul ispoljava a nisu direktno povezane sa procesom autofagije (160). Skorašnje studije pokazuju da je visoka ekspresija Beclin1 markera povezana sa boljim ishodom ovarijalnih karcinoma (161). 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 (153, 161). U skladu sa tim opisana je povezanost odsustva Beclin1 ekspresije kao nezavisnog pokazatelja loše prognoze bolesti pacijentkinja obolelih od ovarijalnog karcinoma (160). Izolovana analiza ekspresije LC3 markera ne pokazuje zadovoljavajuću prognostičku vrednost, dok se udruženim ispitivanjem sa Beclin1 markerom poboljšava prognostički značaj analiziranih molekula (161). Definisanje protokola za validaciju i pravilno tumačenje dobijenih rezultata ekspresije markera autofagije još uvek nije dovoljno standardizovano. Vrsta tehnike imunohistohemijske analize, tip upotrebljenog klona antitela, subjektivnost

istraživača, dodatno utiču na veću varijabilnost dobijenih rezultata. Dvojako ponašanje tumorskih ćelija u procesu autofagije dodatno otežava adekvatno definisanje potencijalnih ključnih markera (103, 162, 163).

Udružena analiza p62, LC3 i Beclin1 markera autofagije omogućava bolji uvid u dinamiku procesa autofagije kod različitih tumora jajnika. Usporedno tumačenje ekspresije ovih markera doprinosi njihovom većem prognostičkom potencijalu. Slično prethodnim studijama, naše istraživanje je pokazalo jaku pozitivnu korelaciju između ekspresija p62 i LC3 markera, dok u odnosu na Beclin1 ekspresiju, p62 i LC3 ispoljavaju negativnu korelaciju (101, 164). S obzirom na zajedničku, dopunjavajuću funkciju p62 i LC3 molekula u procesu autofagije, dobijeni rezultati su očekivani (101). Imunohistohemijska ekspresija svakog markera autofagije analizirana je na centralnim i invazivnim delovima ovarijalnih karcinoma, pri čemu je uočena jaka pozitivna korelacija u svim poređenjima. Do sada ne postoje studije koje porede ekspresije ovih autofagnih markera između različitih segmenata ovarijalnih karcinoma. Naše istraživanje je pokazalo da ne postoji značajna razlika u ekspresijama p62, LC3 i Beclin1 markera u odnosu na delove ovarijalnih karcinoma.

Ovim istraživanjem ispitivali smo povezanosti i razlike p62, LC3 i Beclin1 markera sa kliničkim i patohistološkim parametrima kao što su: starost pacijentkinja, njihov menopauzalni status, maksimalni promer i lateralnost tumora, prisustvo nekroze, limfovaskularne invazije, limfocitonog infiltrata; sa posebnim osvrtom na histološki tip tumora, gradus i FIGO stadijum tumorske bolesti. Pokazana je značajna udruženost sva tri analizirana markera sa pomenutim parametrima, pri čemu ekspresije p62 i LC3 markera pokazuju homogeniju distribuciju u odnosu na heterogeniju Beclin1 ekspresiju. Nije uočena statistički značajna razlika u kategorijama ekspresija sva tri markera u odnosu na starost, menopauzu, maksimalni promer i lateralnost ovarijalnih karcinoma. Tumorska limfovaskularna invazija i limfocitni infiltrat pokazuju statistički značajnu povezanost sa ekspresijama p62, LC3 markera. S obzirom da je prisustvo ovih patohistoloških parametara indikator veće agresivnosti tumora i lošijeg kliničkog toka bolesti, povezanost sa markerima autofagije može ukazivati na agresivnije biološko ponašanje kod tumora koji eksprimiraju analizirane markere. Prisustvo tumorske nekroze nije pokazalo statistički značajnu povezanost sa ekspresijama svih markera.

U odnosu na histološki tip ovarijalnih karcinoma uočena je značajna zastupljenost p62 i LC3 ekspresije u seroznim karcinomima, posebno HGSC tipa. Mucinozni i endometrioidni histološki tipovi, kao i LGSC podtip seroznih karcinoma ne pokazuju statistički značajne ekspresije p62 markera. LC3 ekspresija je pored seroznog (HGSC) značajnije primećena i kod endometrioidnog tipa, dok mucinozni i LGSC tipovi ne pokazuju značajne vrednosti. Analizom učestalosti kategorija Beclin1 ekspresije u odnosu na histološke tipove nije pokazana statistička značajnost. S obzirom na upadljivu zastupljenost HGSC histoloških tipova u analiziranoj grupi ovarijalnih karcinoma, urađena je analiza distribucije ekspresija autofagnih markera u odnosu na delimično grupisane histološke tipove. Ovarijalni karcinomi su grupisani na HGSC i non-HGSC tumore. Analizom takvog uzorka dobijene su značajne vrednosti ekspresija p62 i LC3 markera u HGSC histološkom tipu u odnosu na ostale, dok je Beclin1 marker pokazao oprečne rezultate. HGSC tip je osim zastupljenosti i najagresivniji histološki tip ovarijalnih karcinoma što dodatno može opravdati analitički pristup njegovog isticanja u odnosu na ostale histološke tipove. Studije opisuju mnogo češću učestalost Beclin1 ekspresije kod nisko gradusnih ovarijalnih karcinoma u odnosu na visoko gradusne karcinome (104). Takav obrazac ekspresije ukazuje da je nizak nivo procesa autofagije

udružen sa progresijom ovarijalnog karcinoma, dok je ushodna regulacija autofagije povezana sa manje agresivnim histološkim tipovima ovarijalnog karcinoma (104, 159). 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 (66, 165). Ekspresije p62 i LC3 markera su 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 (158, 160, 165). Opisuje se udruženost Beclin1 ekspresije i diferencijacije tumora, ističući Beclin1 marker kao protektivni faktor ovarijalnih karcinoma (153).

Istraživanja pokazuju da se primenom hemioterapije aktivira proces autofagije u karcinomskim ćelijama. Uočena je značajna ekspresija Beclin1 molekula u karcinomskim ćelijama pacijenata koji su lečeni hemioterapijskim lekovima. Ujedno je primećeno da takvi tumori često postaju terapijski rezistentni (165, 166). Visoka ekspresija LC3 molekula je udružena sa slabim terapijskim efektima primenjene hemioterapije kod pacijentkinja sa agresivnijim histološkim tipovima ovarijalnog karcinoma (96). S obzirom na to, razmatra se kombinovana primena inhibitora autofagije i hemioterapije u lečenju ovarijalnih karcinoma, očekujući bolje terapijske odgovore u odnosu na dosadašnje terapijske modalitete (66, 165, 166). Inhibitori autofagije bi mogli predstavljati obećavajuću terapijsku strategiju u cilju postizanja poboljšanja ishoda bolesti pacijentkinja obolelih od ovarijalnog karcinoma. Analiza ekspresija markera p62, LC3 i Beclin1 u prognostičkom i prediktivnom smislu može doprineti pronalasku efikasnije terapije i lakšeg kliničkog toga ove bolesti. S obzirom na rezultate ovog istraživanja, potencijalna primena inhibitora autofagije bi mogla biti efikasna kod HGSC histološkog tipa ovarijalnih karcinoma koji pokazuju značajnu p62, LC3 i slabu Beclin1 ekspresiju.

Glavna ideja ovog istraživanja je poređenje ekspresije imunosupresivnog PD-L1 receptora i p62, LC3 i Beclin1 autofagnih molekula. Poređenje je vršeno i u centralnim i u invazivnim delovima ovarijalnih karcinoma. Centralni delovi ovarijalnih karcinoma pokazali su statistički značajne razlike između ekspresija PD-L1 markera i ekspresija p62 i LC3 markera. Razlika u ekspresijama je pre svega uslovljena značajno drugačijom zastupljenošću visokih kategorija ekspresija markera. Kategorije visokih ekspresija p62 i LC3 markera pokazuju značajno više vrednosti u odnosu na visoku ekspresiju PD-L1 markera. Poređenja ekspresija PD-L1 i Beclin1 markera nisu pokazala statističke značajnosti iako su vrednosti visoke PD-L1 ekspresije učestalije u odnosu na visoku Beclin1 ekspresiju. Invazivni delovi ovarijalnih karcinoma pokazuju slične rezultate u odnosima među analiziranim markerima. Poređenjem invazivnih delova ovarijalnih karcinoma takođe uočavamo statistički značajne razlike u ekspresijama između PD-L1 i p62 i LC3 markera, pri čemu su u ovim delovima tumora učestalosti kategorija visokih ekspresija sva tri markera približnih vrednosti. Razlika ovog poređenja se zasniva na vrednostima učestalosti niskih stepena ekspresija markera. Poređenjem distribucije učestalosti kategorija ekspresija ova tri markera između centralnih i invazivnih delova karcinoma uočavamo obrnutu razliku u podudarnosti nižih i visokih stepena ekspresije, pri čemu su u centralnim delovima sličnije vrednosti nižih stepena ekspresije za razliku od invazivnih delova gde je veća podudarnost vrednosti između visokih stepena ekspresija. Ekspresija Beclin1 markera nije pokazala statistički značajne razlike u

odnosu na ekspresiju PD-L1 u invazivnim delovima ovarijalnih karcinoma, slično vrednostima centralnih delova tumora.

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. Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresijama svih analiziranih markera bez obzira na starosnu dob pacijentkinja. U odnosu na menopauzalni status pacijentkinja primećena je značajna razlika samo u ekspresiji LC3 markera koja je kod žena u menopauzi izraženija u odnosu na PD-L1 ekspresiju. Bilateralni ovarijalni karcinomi pokazuju značajno izraženiju ekspresiju p62 i LC3 markera u odnosu na PD-L1 ekspresiju. Svi ovarijalni karcinomi veličine veće od 80 mm pokazali su značajno višu ekspresiju p62 i LC3 markera u odnosu na PD-L1 ekspresiju. Beclin1 ekspresija nije pokazala statistički značajne različitosti u odnosu na PD-L1 ekspresiju bez obzira na lateralnost i maksimalni promer karcinoma iako su vrednosti učestalosti PD-L1 ekspresije izraženije u odnosu na Beclin1 marker i to češće kod unilateralnih karcinoma manjih od 80mm.

Analiza ekspresije PD-L1 markera u odnosu na ekspresije p62, LC3 i Beclin1 markera rađena je u odnosu na najučestalije histološke tipove ovarijalnih karcinoma. Nisu uočene statistički značajne razlike među analiziranim markerima kod svih ispitivanih histoloških tipova. Serozni ovarijalni karcinomi pokazuju veću učestalost visoke ekspresije p62, LC3 i Beclin1 markera u odnosu na PD-L1 marker, što se prevashodno odnosi na HGSC histološki podtip. Mucinozni i endometrioidni ovarijalni karcinomi takođe pokazuju veću zastupljenost visokih stepena ekspresije markera p62 i LC3 u odnosu na PD-L1 ekspresiju. Ekspresija Beclin1 markera je u sličnom odnosu učestalosti sa PD-L1 markerom u endometrioidnim karcinomima, dok se u mucinoznim uočava značajnija učestalost visoke PD-L1 ekspresije u odnosu na Beclin1 marker. Analizirane statističke značajnosti ukazuju na jednaku udruženu potencijalnu prognostičku vrednost ispitivanih markera kod svih histoloških tipova.

Poređenje ekspresija analiziranih markera u odnosu na FIGO stadijume nije pokazalo statistički značajne razlike. Stadijum FIGO I pokazuje identične distribucije učestalosti PD-L1 markera u odnosu na p62, LC3 i Beclin1 markere. Uočava se dominantna povezanost slabijih stepena ekspresije svih markera sa FIGO I stadijumom. Svaki od markera autofagije pokazuje laku predominaciju visoke ekspresije u odnosu na PD-L1 visoku ekspresiju. Stadijum FIGO II i IV su ređe zastupljeni. Najučestaliji je FIGO III stadijum koji pokazuje izraženu učestalost visokih ekspresija svih markera, pri čemu se uočava neznatno češća zastupljenost visokih p62 i LC3 ekspresija u odnosu na PD-L1 ekspresiju, dok je u odnosu na Beclin1 visoku ekspresiju, PD-L1 visoka ekspresija učestalija. Stepennost histološke diferencijacije tumora (gradus) nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na ekspresije analiziranih markera. Prisustvo nekroze, tumorske limfovaskularne invazije, peritumorskog i intratumorskog limfocitnog zapaljenskog infiltrata se nije statistički značajno razlikovalo u odnosu na bilo koji od analiziranih markera.

Međusobno poređenje ekspresija imunosupresivnih i autofagnih markera nije dovoljno zastupljeno u dosadašnjoj literaturi. Do sada je takvo poređenje analizirano samo na ćelijskim kulturama (106). Uporedna imunohistohemijska analiza ovih markera na patohistološki obrađenom tkivu ovarijalnih 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 (107, 109). 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 ovarijalnog karcinoma (40, 106).

Značaj i jačinu povezanosti autofagije i PD-1/PD-L1 mehanizma podržavaju istraživanja terapijskih efekata inhibitora TBK1 (*Tank binding kinase-1*) i JAK (*Janus kinase*) kinaze koji pored autofagije inhibiraju i PD-L1 ekspresiju (167). S obzirom na zajedničku regulaciju navedenih procesa pretpostavlja se veća efikasnost sinergističkog terapijskog dejstva primene inhibitora autofagije i inhibitora PD-1/PD-L1 signalnog puta (40).

Proces autofagije je primećen i u imunološkim ćelijama u neposrednoj okolini tumora. Aktivacijom PD-1 receptora na T-limfocitima dolazi do inhibiranja unosa glukoze i procesa glikolize unutar ćelije. Inhibicija glikolize dovodi do ćelijskog gladovanja i stimuliše proces autofagije aktivacijom AMP protein kinaze i mTORC1 mehanizma. Pokazano je da tumorske ćelije koje eksprimiraju enzim IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*) i dolaze u interakciju sa T-limfocitima dovode do imunosupresije usled stvaranja metabolita triptofana. Smrt T-limfocita posredovana metabolitima triptofana uzrokovana je indukcijom apoptoze. Takođe se pretpostavlja da trošenje esencijalne aminokiseline triptofana može dovesti do autofagije u T-limfocitima (40). Veliki je potencijal udruženog dejstva primene inhibitora autofagije sa inhibitorima PD-L1 receptora. S obzirom na to da je autofagija samo jedan od imunološki kontrolisanih intracelularnih mehanizama ćelijske smrti, mnogi drugi pridruženi ćelijski procesi bi mogli biti predmet daljih istraživanja u cilju pronalaženja efikasnijih terapijskih rešenja (40).

Značaj procesa autofagije u odnosu na antitumorski imunološki sistem odnosi se na regulaciju prezentacije tumorskih antigena, citotoksičnost T-limfocita i NK ćelija, egzocitozu enzima lizozoma u cilju uništavanja imunoloških ćelija. Aktivacijom autofagije unutar tumorskih ćelija obezbeđuje se njihovo preživljavanje kao i izbegavanje imunološkog odgovora očuvanjem sposobnosti tumorskih ćelija da razgrađuju antitumorske enzime i faktore koji se sekretuju iz imunoloških ćelija, pre svega CD8+ T-limfocita i NK ćelija (59, 82, 92). Jedan od glavnih doprinosa autofagije imunitetu je ćelijska autonomna kontrola inflamacije kojom se utiče na diferencijaciju imunoloških ćelija, njihovo pravilno usmeravanje i sticanje adekvatne funkcije, što je pre svega značajno za održavanje populacije efektorskih T-limfocita (168). Imunološke ćelije kao što su makrofagi, Treg-limfociti, dendritične ćelije, koriste procese autofagije u svom sazrevanju. Prilikom sazrevanja pomoću autofagije regulišu se metabolički intracelularni mehanizmi. Vrsta i funkcija sazrevajućih imunoloških ćelija u odnosu na inflamatorne procese posredno ukazuju na značajan uticaj autofagije u regulaciji inflamacije koja je česta u tumorima (169). Inflamacija u tumorskom mikrookruženju stimuliše procese autofagije i promoviše tumorski rast i preživljavanje (59, 83).

Autofagija utiče na ćelijski metabolizam tokom diferencijacije imunoloških ćelija. Za vreme diferencijacije monocita u makrofage vrlo je značajno izbegavanje aktivacije kaspaza i apoptoze što je regulisano procesom autofagije. Autofagija takođe reguliše prisustvo i funkciju mitohondrija u ćeliji prilikom sazrevanja NK ćelija. Regulacija ćelijskog metabolizma kojom se ostvaruju funkcije Treg i memorijskih T-limfocita ključna je funkcija autofagije u sazrevanju imunološkog sistema. Procesi autofagije odstranjuju oštećene i utiču na modifikaciju novih intraćelijskih proteina što dovodi do pravilne diferencijacije imunoloških ćelija. Primer je sazrevanje B-limfocita u plazmocite koji sekretuju specifične imunoglobuline (169).

Cilj uporedne imunohistohemijske analize ekspresija markera imunosupresije i autofagije je definisanje bitnih prognostičkih parametara koji bi mogli odrediti efikasnije terapijske postupke. S obzirom na značajnu udruženost ekspresija analiziranih markera, pretpostavlja se udruženo prisustvo aktiviranih imunosupresivnih tumorskih mehanizama i aktiviranih intratumorskih procesa autofagije. Značajna, visoka ekspresija analiziranih markera sugeriše opravdanu indikaciju simultane upotrebe PD-L1 inhibitora i inhibitora autofagije u lečenju ovarijalnih karcinoma. Slaba ekspresija ovih markera mogla bi sugerisati lošiji terapijski odgovor i veći rizik za relaps bolesti. Analizom stepena ekspresije markera imunosupresije i autofagije mogle bi se odrediti validne granične vrednosti koje bi imale 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 karcinoma jajnika.

PD-1/PD-L1 blokiranjem može se uticati uglavnom na tumore sa izraženom imunološkom reakcijom. Tumori koji izazivaju slabiji imunološki odgovor ne reaguju na samostalnu imunološku terapiju. Aktuelno se istražuje način unapređenja efikasnosti imunološke terapije zajedničkom primenom drugih vidova imunosupresivne terapije kao što su inhibitori molekula CD137, OX40, IDO (170). Pokazano je da su kod uznapredovalih karcinoma sa slabo izraženim TIL odgovorom i kod tumora bez izražene odbrambene reakcije, povoljniji efekti lečenja udruženom primenom različitih imunoloških terapija (171). Takođe se ispituje zajednička primena imunoterapije sa hemioterapijom i radioterapijom, koja pokazuje značajne terapijske odgovore (172). Smatra se da primena hemioterapije dovodi do ushodne regulacije PD-L1 receptora na tumorskim ćelijama, stvarajući veći broj ciljanih molekula za primenu imunološke terapije monoklonskim anti PD-L1 antitelima (173). Udruženom primenom hemioterapije i imunološke terapije direktno se izaziva apoptoza tumorskih ćelija, pri čemu se oslobađaju tumorski antigeni koji dodatno stimulišu antitumorski imunološki odgovor. Radioterapija deluje na imunološke interćelijske procese ispoljavajući značajne efekte u tumorskom mikrookruženju delujući na stromalne, endotelne i različite populacije imunoloških ćelija. Dejstvo zračenja na imunološke strukture je kontradiktorno, kontinuirano u određenom vremenskom periodu. Imunostimulacioni efekti podrazumevaju stimulaciju ekspresije površinskog MHC I molekula na različitim karcinomskim ćelijama, dovodeći do izraženije prezentacije tumorskih antigena. Takođe se uočava povećan broj CD8⁺ T-limfocita. Radioterapija stimuliše ekspresiju vaskularnog adhezionog molekula VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) na endotelnim ćelijama što olakšava transport TIL-a ka tumorskim ćelijama. Takođe dovodi do stimulacije citotoksične aktivnosti NK ćelija. Imunosupresivni efekti su predstavljeni ushodnom regulacijom ekspresije PD-L1 molekula na tumorskim ćelijama, aktivacijom imunosupresivnih efekata Treg-limfocita, tumor udruženih makrofaga i neutrofila. Brojni molekularni i intraćelijski mehanizmi pod uticajem radioterapije dovode do olakšavanja

prepoznavanja i eliminacije ozračenih karcinomskih ćelija dejstvom imunološkog sistema (174). Primenom radioterapije i hemioterapije tumorske ćelije umiru različitim mehanizmima (apoptoza, nekroza, autofagija). Cisplatin dovodi do formiranja unakrsnih i brojnih drugih intramolekularnih veza na DNK tumorskih ćelija, koji posledično dovode do apoptoze (29). Autofagija kao jedan od mehanizama ćelijske smrti aktuelno se istražuje u cilju pronalaženja boljih terapijskih rešenja primenom kombinovanih terapijskih modela. Dokazano je da inhibitori autofagije imaju svoju opravdanu primenu u lečenju karcinoma. Udruženom primenom inhibitora autofagije sa hemioterapijom dolazi do sinergističkog terapijskog delovanja i efikasnije eradikacije tumorskih ćelija (175).

Tumorske ćelije mogu sekretovati proangiogene faktore (VEGF) koji podstiču imunosupresiju. Primena inhibitora VEGF receptora (Bevacizumab) stimuliše intratumorsku T-limfocitnu infiltraciju, povećava koncentraciju CD8+ T-limfocita i redukuje prisustvo Treg-limfocita. Zajednička primena Bevacizumaba i inhibitora „*checkpoint*“ imunoloških sistema pokazuje povoljne terapijske efekte kod pacijentkinja sa uznapredovalim i recidivirajućim ovarijalnim karcinomom. Dokazana je značajna efikasnost udružene primene inhibitora PD-L1 receptora i PARP inhibitora kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke. Smatra se da bi se slični terapijski efekti postigli kod pacijentkinja sa ovarijalnim karcinomom koje imaju BRCA genetske mutacije (25, 43).

Poznato je da se unutar tumora dešavaju dodatne mutacije gena prilikom čega se stvaraju novi antigeni i posledično specifični T-limfociti. Istraživanja uticaja novih mutacija tumora na efekte PD-L1 inhibitora pokazala su bolje terapijske odgovore kod tumora sa većim mutacionim opterećenjem. Primena Avelumab-a u lečenju pacijentkinja sa ovarijalnim karcinomom pokazala je veću terapijsku efikasnost kod pacijentkinja sa većim brojem mutacija. Prisustvo mutacija BRCA i drugih gena regulatora popravke DNK sa karakteristikama mikrosatelitske nestabilnosti povezano je sa većom zastupljenošću TIL-a, značajnom ekspresijom PD-L1 markera na karcinomskim ćelijama jajnika i dijagnostikom pacijentkinja u ranijim stadijumima bolesti. Značaj ovih rezultata ogleda se pravilnijoj selekciji pacijenata za primenu imunosupersivne terapije. Pacijenti sa detektovanim raznovrsnijim i novim mutacijama unutar tumora mogli bi bolje reagovati na primenu PD-L1 inhibitora (35, 54, 170, 176).

Epigenetske modifikacije mutiranih gena posredno utiču na terapijske efekte menjajući ekspresiju novonastalih antigena. Epigenetski procesi kao što je metilacija DNK mogu smanjiti ekspresiju pojedinih gena bitnih u regulaciji imunološkog odgovora. Hipometilacija IL-10 detektovana je u karcinomu dojke. Epigenetsko suprimiranje proapoptotskih gena, može se naći kod K-RAS mutacija (20, 170). Epigenetske promene mogu nastati u genima regulatorima imunoloških „*checkpoint*“ sistema prilikom čega dolazi do imunosupresije. Epigenetske modifikacije signalnog puta INF- γ povezane su sa rezistencijom na CTLA-4 inhibitore. Epigenetski modifikatori su nove terapijske mogućnosti koje bi mogle regulisati epigenetske modulacije i posredno pravilnu funkciju „*checkpoint*“ imunoloških mehanizama. Istraživanje regulacije procesa interakcije epigenetskih i imunoloških modulacija mogu dovesti do specifičnije, efektivnije ciljane antitumorske terapije (177).

Terapijski odgovor pacijenata na primenu imunoterapije je različit i zavisi od osnovnog stanja imunološkog sistema. U odnosu na efikasnost terapijskog odgovora istraživanja definišu četiri kategorije tumora; „*hot, altered-excluded, altered-*

immunosuppressed i cold". Ideja za definisanje ovih tumorskih kategorija zasnovana je na dokazanom značajnom uticaju tipa, gustine raspoređenosti i lokalizacije imunoloških ćelija unutar tumora. Na osnovu toga definisane su skale zasnovane na koncentracijama CD3+ i CD8+ T-limfocitnih ćelija lokalizovanih u centralnim delovima tumora ili u delovima najizraženije tumorske invazije u okolno tkivo. Tumori sa na najvećom koncentracijom T-limfocita označeni su kao „hot“, za razliku od „cold“ tumora koji pokazuju odsustvo T-limfocita i nalaze se na suprotnom kraju skale. Istraživanja rađena na tkivu kolorektalnog karcinoma pokazuju mnogo veći prognostički značaj prisustva limfocita u tumorskom tkivu u odnosu na standardnu TNM klasifikaciju bolesti. U odnosu na ovu poddelu razmatraju se adekvatniji terapijski postupci koji uglavnom podrazumevaju kombinovanu primenu različitih vrsta imunoterapije. Najčešća terapijska kombinacija su inhibitori PD-L1 receptora i CTLA-4 kontrolnog punkta. Takođe se ispituju efekti inhibicije pridruženih kostimulatornih molekula kao što je LAG3 (*Lymphocyte activation gene 3*), koinhibitorni receptor na T-limfocitima koji između ostalog utiče na aktivaciju Treg-limfocita (29, 178).

U cilju istraživanja efekata terapije PD-L1 inhibitorima tumorsko mikrokruženje je podeljeno u četiri kategorije. Tip I podrazumeva prisustvo PD-L1 ekspresije i TIL-a, za razliku od tipa II gde su oba parametra odsutna. Tip III označava ekspresiju PD-L1 uz odsustvo TIL-a, dok je tip IV sa obrnutim karakteristikama tj. odsustvom ekspresije PD-L1 i prisutnim TIL-om. Tip I predstavlja tumorsko mikrokruženje u kome tumor infiltrišući limfociti sekretuju INF- γ i stimulišu ekspresiju PD-L1 na tumorskim ćelijama, ukazujući na najpovoljnije efekte PD-L1 inhibitorne terapije. Pacijenti sa PD-L1 negativnom tumorskom ekspresijom i dalje mogu reagovati na imunosupresivnu terapiju udruženom primenom inhibitora PD-1 i CTLA-4 receptora, koji sinergističkim dejstvom dovode do veće zastupljenosti TIL-a i boljih terapijskih efekata (36, 41).

Inhibicija gena i proteina DNK popravke unutar karcinomskih ćelija dojke, pankreasa i debelog creva, pokazala je značajne efekte tumorske supresije ukazujući na moguću terapijsku primenu inhibitora karcinomskih mehanizama DNK popravke. Terapija CAR (*Chimeric Antigen Receptor*) T-limfocitima jedna je od najnovih terapijskih metoda. Zasniva se na veštački modifikovanim T-limfocitima nastalim najčešće transdukcijom virusnih vektora unutar izolovanih T-limfocita pacijenata. Tako modifikovani T-limfociti na svojim površinama ispoljavaju veći broj različitih CAR antigena koji efikasnije prepoznaju tumorske ćelije i uništavaju ih. Modifikovani CAR T-limfociti pokazuju veću specifičnost dejstva, visok procenat efikasnosti uništavanja karcinomskih ćelija i dugotrajni terapijski efekat, što ukazuje na obećavajuće terapijsko rešenje zasnovano na regulaciji imunoloških procesa (178).

6. ZAKLJUČCI

1. Stepen PD-L1 ekspresije je značajno češći u ovarijalnim karcinomima u odnosu na APT i benigne epitelne tumore jajnika.
2. Serozni histološki tip (HGSC) karcinoma jajnika pokazuje najizraženiju PD-L1 ekspresiju i to u višim FIGO stadijumima tumorske bolesti.
3. Značajno viša PD-L1 imunoekspresija postoji u invazivnim nego u centralnim područjima HGSC.
4. Dokazana je pozitivna korelacija višeg stepena ekspresije PD-L1 u centralnim područjima HGSC sa stepenom reaktivnog intratumorskog limfocitnog infiltrata.
5. Ekspresije p62, LC3 i Beclin1 markera autofagije su češće u ovarijalnim karcinomima u odnosu na APT i benigne epitelne tumore jajnika.
6. Ekspresije markera p62, LC3 i Beclin1 ne pokazuju značajne razlike između centralnih i invazivnih područja ovarijalnih karcinoma.
7. Prisutna je pozitivna međusobna korelacija u stepenu imunoekspresije markera p62 i LC3, dok ta korelacija ima negativan smer kada se testira povezanost pomenutih markera sa imunoekspresijom Beclin1.
8. Ekspresije p62 i LC3 markera su češće u HGSC histološkom tipu ovarijalnih karcinoma za razliku od Beclin1 ekspresije koja je češća u ostalim histološkim tipovima.
9. Ekspresije p62 i LC3 markera su udružene sa višim gradusima i FIGO stadijumima za razliku od Beclin1 ekspresije.
10. Visoke ekspresije PD-L1, p62 i LC3 markera značajno su zastupljene u invazivnim delovima ovarijalnih karcinoma.
11. Odnos ekspresije PD-L1 prema ekspresiji p62, LC3 i Beclin1 ne menja se s obzirom na histološki tip ovarijalnog karcinoma, FIGO stadijum, kao ni s obzirom na ostale prognostički značajne patohistološke parametre tumorske bolesti.
12. Istovremeno postojanje i međusobna povezanost ekspresije PD-L1 i markera autofagije ukazuje na postojanje simultane aktivacije imunosupresivnih antitumorskih i tumorskih autofagnih procesa u ovarijalnim karcinomima.
13. Zajednička aktivacija imunosupresivnih i autofagnih mehanizama u ovarijalnim karcinomskim ćelijama može biti indikacija za sinergističku primenu ciljane, imunološke terapije PD-L1 inhibitorima i terapije inhibitorima autofagije.
14. HGSC histološki tip ovarijalnog karcinoma pokazuje značajne p62, LC3 i PD-L1 ekspresije ukazujući na potencijalnu primenu imunološke terapije PD-L1 inhibitorima i terapije inhibitorima autofagije upravo kod ovog tipa karcinoma jajnika.

7. LITERATURA

1. Nucci MR, Oliva E. *Gynecologic Pathology: A Volume in the Series Foundations in Diagnostic Pathology*. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2009. Internet resource.
2. De Leo A, Santin, D, Ceccarelli C, Santandrea G, Palicelli A, Acquaviva G, et al. What Is New on Ovarian Carcinoma: Integrated Morphologic and Molecular Analysis Following the New 2020 World Health Organization Classification of Female Genital Tumors. *Diagnostics* 2021; 11:697.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3):209-249.
4. Wright JD, Chen L, Tergas AI, Patankar S, Burke WM, Hou JY, et al. Trends in relative survival for ovarian cancer from 1975 to 2011. *Obstet Gynecol* 2015; 125(6):1345-1352.
5. Matulonis U, Sood A, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2:16061.
6. Köbel M, Kang EY. The Evolution of Ovarian Carcinoma Subclassification. *Cancers (Basel)* 2022; 14(2):416.
7. Howitt BE, Strickland KC, Sholl LM, Rodig S, Ritterhouse LL, Chowdhury D, et al. Clear cell ovarian cancers with microsatellite instability: A unique subset of ovarian cancers with increased tumor-infiltrating lymphocytes and PD-1/PD-L1 expression. *Oncoimmunology* 2017; 6(2):e1277308.
8. Seidman JD, Kurman RJ, Ronnett BM. Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries: incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(7):985-93.
9. Peres LC, Cushing-Haugen KL, Köbel M, Harris HR, Berchuck A, Rossing MA, et al. Invasive Epithelial Ovarian Cancer Survival by Histotype and Disease Stage. *J Natl Cancer Inst* 2019; 111(1):60-68.
10. Pieretti M, Hopenhayn-Rich C, Khatrar NH, Cao Y, Huang B, Tucker TC. Heterogeneity of ovarian cancer: relationships among histological group, stage of disease, tumor markers, patient characteristics, and survival. *Cancer Invest* 2002; 20(1):11-23.
11. Nossov V, Amneus M, Su F, Lang J, Janco JM, Reddy ST, et al. The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125? *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199(3):215-23.
12. Jacobs I, Davies AP, Bridges J, Stabile I, Fay T, Lower A, et al. Prevalence screening for ovarian cancer in postmenopausal women by CA 125 measurement and ultrasonography. *BMJ* 1993; 306(6884):1030-4.
13. Høgdall EV, Christensen L, Kjaer SK, Blaakaer J, Kjaerbye-Thygesen A, Gayther S, et al. CA125 expression pattern, prognosis and correlation with serum CA125 in ovarian tumor patients. From The Danish "MALOVA" Ovarian Cancer Study. *Gynecol Oncol* 2007; 104(3):508-15.
14. Colombo N, Sessa C, du Bois A, Ledermann J, McCluggage WG, McNeish I, et al. ESMO-ESGO Ovarian Cancer Consensus Conference Working Group. ESMO-ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease. *Ann Oncol* 2019; 30(5):672-705.
15. Tewari KS, Burger RA, Enserro D, Norquist BM, Swisher EM, Brady MF, et al. Final Overall Survival of a Randomized Trial of Bevacizumab for Primary Treatment of Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* 2019; 37(26):2317-2328.

16. Konstantinopoulos PA, Lheureux S, Moore KN. PARP Inhibitors for Ovarian Cancer: Current Indications, Future Combinations, and Novel Assets in Development to Target DNA Damage Repair. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2020;v40:1-16.
17. Chen D, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 2013; 39(1):1-10.
18. Landskron J, Helland O, Torgersen KM, Aandahl EM, Gjertsen BT, Bjorge L, et al. Activated regulatory and memory T-cells accumulate in malignant ascites from ovarian carcinoma patients, *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64:337-347.
19. Ojalvo LS, Thompson ED, Wang TL, Meeker AK, Shih IM, Fader AN, et al. Tumor-associated macrophages and the tumor immune microenvironment of primary and recurrent epithelial ovarian cancer. *Hum Pathol* 2018; 74:135-147.
20. Bhatia A, Kumar Y. Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review. *Expert Rev. Clin. Immunol* 2014; 10(1):41-62.
21. Motalebnezhad M, Jadidi-Niaragh F, Qamsari ES, Bagheri S, Gharibi T, Yousefi M. The immunobiology of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Tumour Biol* 2016; 37(2):1387-406.
22. Aktipis CA, Boddy AM, Jansen G, Hibner U, Hochberg ME, Maley CC, et al. Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2015; 370:2014-0219.
23. Banerjee S, Halder K, Bose A, Bhattacharya P, Gupta G, Karmahapatra S, et al. TLR signaling-mediated differential histone modification at IL-10 and IL-12 promoter region leads to functional impairments in tumor-associated macrophages. *Carcinogenesis* 2011; 32(12):1789-1797.
24. Obata N, Tamakoshi HK, Shibata K, Kikkawa F, Tomoda Y. Effects of interleukin-6 on in vitro cell attachment, migration and invasion of human ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 1997; 17(1A):337-342.
25. Zhu X, Lang J. Programmed death-1 pathway blockade produces a synergistic antitumor effect: combined application in ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* 2017; 28(5):e64.
26. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:203-213.
27. Darb-Esfahani S, Kunze CA, Kulbe H, Sehouli J, Wienert S, Lindner J, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(2):1486-99.
28. Eno J. Immunotherapy Through the Years. *J Adv Pract Oncol* 2017; 8(7):747-753.
29. Sautès-Fridman C, Petitprez F, Calderaro J, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2019; 19:307-325.
30. Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2012; 124(2):192-198.
31. Fialova A, Partlova S, Sojka L, Hromadkova H, Brtnicky T, Fucikova J, et al. Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *Int J Cancer* 2013; 132(5):1070-1079.
32. Piao J, Lim HJ, Lee M. Prognostic value of programmed cell death ligand-1 expression in ovarian cancer: an updated meta-analysis. *Obstet Gynecol Sci* 2020; 63(3):346-356.

33. Pitt JM, Vétizou M, Daillère R, Roberti MP, Yamazaki T, Routy B, et al. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity* 2016; 44(6):1255-1269.
34. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 2017; 541(7637):321-330.
35. Hamanishi J, Mandai M, Konishi I. Immune checkpoint inhibition in ovarian cancer. *International Immunology* 2016; 28(7):339-348.
36. Cunha LL, Marcello MA, Rocha-Santos V, Ward LS. Immunotherapy against endocrine malignancies: immune checkpoint inhibitors lead the way. *Endocrine-Related Cancer* 2017 24:261-281.
37. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol* 2018; 18(3):153-167.
38. Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clin Ther* 2015;37(4):764-82.
39. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular pathways: next-generation immunotherapy-inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin Cancer Res* 2012; 18(24):6580-6587.
40. Robainas M, Otano R, Bueno S, Ait-Oudhia S. Understanding the role of PD-L1/PD1 pathway blockade and autophagy in cancer therapy. *Onco Targets Ther.* 2017; 10:1803-1807.
41. Ribas A, Hu-Lieskovan S. What does PD-L1 positive or negative mean? *J Exp Med* 2016; 213(13):2835-2840.
42. Wei H, Zhao L, Hellstrom I, Hellstrom KE, Guo Y. Dual targeting of CD137 co-stimulatory and PD-1 co-inhibitory molecules for ovarian cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2014; 3:e28248.
43. Ventriglia J, Paciolla I, Pisano C, Cecere SC, Di Napoli M, Tambaro R, et al. Immunotherapy in ovarian, endometrial and cervical cancer: State of the art and future perspectives. *Cancer Treat Rev* 2017; 59:109-116.
44. Pardoll D, Drake C. Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy. *J Exp Med* 2012; 209(2):201-209.
45. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363(8):711-723.
46. Wolchok JD, Neyns B, Linette G, Negrier S, Lutzky J, Thomas L, et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* 2010; 11(2):155-164.
47. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4):252-64.
48. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26):2443-54.
49. Wong RM, Scotland RR, Lau RL, Wang C, Korman AJ, Kast WM, et al. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *Int Immunol* 2007; 19(10):1223-1234.
50. Heymann JJ, Bulman WA, Swinarski D, Pagan CA, Crapanzano JP, Haghghi M, et al. PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma: Comparison among cytology, small biopsy, and surgical resection specimens. *Cancer Cytopathol* 2017; 125(12):896-907.
51. Webb JR, Milne K, Watson P, Deleeuw RJ, Nelson BH. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20:434-44.

52. Dong H, Zhu G, Tamada K, Flies D, van Deursen JM, Chen L. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. *Immunity* 2004; 20(3):327-336.
53. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006; 203(4):883-895.
54. Morse C, Elvin J, Gayb L, Liaoa J. Elevated tumor mutational burden and prolonged clinical response to anti-PD-L1 antibody in platinum-resistant recurrent ovarian cancer. *Gynecologic Oncology Reports* 2017; 21:78-80.
55. Ravanan P, Srikumar IF, Talwar P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci* 2017; 188:53-67.
56. Reggiori F, Klumperman J. Lysosome Biogenesis and Autophagy. In Maxfield FR, Willard JM, Lu S, editors, *LYSOSOMES: Biology, Diseases, and Therapeutics*. Elsevier 2016; 7-31.
57. Highlighting advances in autophagy. *Nat Cell Biol* 2018; 20(3):223.
58. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol* 2018; 20:521-527.
59. Li YY, Feun LG, Thongkum A, Tu CH, Chen SM, Wangpaichitr M, et al. Autophagic Mechanism in Anti-Cancer Immunity: Its Pros and Cons for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2017; 18(6):1297.
60. Marinković M, Šprung M, Buljubašić M, Novak I. Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018:8023821.
61. Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16(8):461-472.
62. Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol* 2018; 20(3):233-242.
63. Münch C, Dikic I. Hitchhiking on selective autophagy. *Nat Cell Biol* 2018; 20(2):122-124.
64. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016;12(1):1-222.
65. Farré J, Subramani S. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17:537-552.
66. Bortnik S, Gorski M. Clinical Applications of Autophagy Proteins in Cancer: From Potential Targets to Biomarkers. *Int. J. Mol. Sci* 2017; 18:1496.
67. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19:349-364.
68. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; 90:1383-1435.
69. Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* 2005; 1:1-10.
70. Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* 2010; 12:831-835.
71. Joshi AS, Zhang H, Prinz WA. Organelle biogenesis in the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 2017; 19(8):876-882.
72. Kennedy BK, Lamming DW. The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand Conductor of Metabolism and Aging. *Cell Metab* 2016; 23(6):990-1003.

73. Bento C.F, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, et al. Mammalian autophagy: How does it work? *Annu. Rev. Biochem* 2016; 85:685-713.
74. Green D.R, Levine B. To be or not to be?: How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell* 2014; 157:65-75.
75. Nguyen T.N, Padman B.S, Usher J, Oorschot V, Ramm G, Lazarou M. Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome–lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *J. Cell Biol* 2016; 215: 857-874.
76. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* 2010; 29:1792-1802.
77. Miyamoto M, Takano M, Aoyama T, et al. Inhibition of autophagy protein LC3A as a therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas. *J Gynecol Oncol* 2017; 28(3):e33.
78. Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* 2018; 14(2):207-215.
79. Mowers EE, Sharifi MN, Macleod KF. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis. *FEBS J* 2018; 285(10):1751-1766.
80. Galluzzi L, Ballabio A, Boya P, Cuervo AM, Deretic V, Dikic I, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO Journal Online* 2017; 36(13):1811-1836.
81. Wu WK, Coffelt SB, Cho CH, Wang XJ, Lee CW, Chan FK et al. The autophagic paradox in cancer therapy. *Oncogene* 2012; 31:939-953.
82. Rybstein M, Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L. The autophagic network and cancer. *Nature Cell Biology* 2018; 20:243-251.
83. Ngabire D, Kim GD. Autophagy and Inflammatory Response in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci* 2017; 18(9):2016.
84. Kimmelman AC, White E. Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metab* 2017; 25(5):1037-1043.
85. Santana-Codina N, Mancias JD, Kimmelman AC. The Role of Autophagy in Cancer. *Annu Rev Cancer Biol* 2017; 1:19-39.
86. Amaravadi RK. Autophagy-induced tumor dormancy in ovarian cancer. *J Clin Invest* 2008; 118(12):3837-3840.
87. Hu J, Meng Y, Zhang Z, Yan Q, Jiang X, Lv Z, Hu L. MARCH5 RNA promotes autophagy, migration, and invasion of ovarian cancer cells. *Autophagy* 2017; 13(2):333-344.
88. Peracchio C, Alabiso O, Valente G, Isidoro C. Involvement of autophagy in ovarian cancer: a working hypothesis. *Journal of Ovarian Research* 2012; 5:22.
89. Ho TT, Warr MR, Adelman ER, Lansinger OM, Flach J, Verovskaya EV, et al. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* 2017; 543(7644):205-210.
90. Peng Q, Qin J, Zhang Y, Cheng X, Wang X, Lu W, et al. Autophagy maintains the stemness of ovarian cancer stem cells by FOXA2. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2017; 36:171.
91. Katheder NS, Khezri R, O'Farrell F, Schultz SW, Jain A, Rahman MM, et al. Microenvironmental autophagy promotes tumour growth. *Nature* 2017; 541(7637):417-420.
92. Viry E, Noman MZ, Arakelian T, Lequeux A, Chouaib S, Berchem G, et al. Hijacker of the Antitumor Immune Response: Autophagy Is Showing Its Worst Facet. *Front Oncol* 2016; 6:246.

93. Davidson SM, Vander Heiden MG. Critical Functions of the Lysosome in Cancer Biology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017; 57:481-507.
94. Rebecca V.W, Amaravadi R.K. Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. *Oncogene* 2016; 35:1-11.
95. Levy J, Towers C, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2017; 17:528-542.
96. Miyamoto M, Takano M, Aoyama T, Soyama H, Yoshikawa T, Tsuda H, et al. Inhibition of autophagy protein LC3A as a therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas. *J Gynecol Oncol* 2017;28(3):e33.
97. Rangwala R, Leone R, Chang Y.C, Fecher L.A, Schuchter L.M, Kramer A, et al. Phase I trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy* 2014; 10:1369-1379.
98. Poklepovic A, Gewirtz D.A. Outcome of early clinical trials of the combination of hydroxychloroquine with chemotherapy in cancer. *Autophagy* 2014; 10:1478-1480.
99. Rosenfeld M.R, Ye X, Supko J.G, Desideri S, Grossman S.A, Brem S, et al. A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Autophagy* 2014; 10:1359-1368.
100. Amaravadi R, Kimmelman AC, White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev* 2016; 30(17):1913-1930.
101. Schläfli AM, Berezowska S, Adams O, Langer R, Tschan MP. Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry. *Eur J Histochem* 2015; 59(2):2481.
102. Wang J, Garbutt C, Ma H, Gao P, Hornicek FJ, Kan Q, et al. Expression and role of autophagy-associated p62 (SQSTM1) in multidrug resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2018;150(1):143-150.
103. Lazova R, Camp R.L, Klump V, Siddiqui S.F, Amaravadi R.K, Pawelek J.M. Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. *Clin. Cancer Res. J. Am. Assoc. Cancer Res* 2012; 18:370-379.
104. Valente G, Morani F, Nicotra G, Fusco N, Peracchio C, Titone R, et al. Expression and clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer. *Biomed Res Int* 2014; 2014:462658.
105. Schmitz KJ, Ademi C, Bertram S, Schmid KW, Baba HA. Prognostic relevance of autophagy-related markers LC3, p62/sequestosome 1, Beclin-1 and ULK1 in colorectal cancer patients with respect to KRAS mutational status. *World J Surg Oncol* 2016; 14(1):189.
106. Clark CA, Gupta HB, Sareddy G, Pandeswara S, Lao S, Yuan B, et al. Tumor-intrinsic PD-L1 signals regulate cell growth, pathogenesis, and autophagy in ovarian cancer and melanoma. *Cancer Res* 2016; 76(23):6964-74.
107. Clark C, Gupta H, Curiel T. Tumor cell-intrinsic CD274/PD-L1: A novel metabolic balancing act with clinical potential. *Autophagy* 2017; 13(5):987-988.
108. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646-674.
109. Brogden K, Vali S, Abbasi T. PD-L1 is a diverse molecule regulating both tumor-intrinsic signaling and adaptive immunosuppression. *Transl Cancer Res* 2016; 5(7):1396-1399.
110. Qu QX, Xie F, Huang Q, Zhang XG. Membranous and Cytoplasmic Expression of PD-L1 in Ovarian Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem* 2017; 43(5):1893-1906.

111. Choi CH, Kim KH, Song JY, Choi SJ, Kim L, Park IS, et al. Construction of high-density tissue microarrays at low cost by using self-made manual microarray kits and recipient paraffin blocks. *Korean J Pathol* 2012; 46(6):562-8.
112. Scognamiglio G, De Chiara A, Di Bonito M, Tatangelo F, Losito NS, Anniciello A, et al. Variability in Immunohistochemical Detection of Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) in Cancer Tissue Types. *Int J Mol Sci* 2016; 17:790.
113. Kerr KM, Hirsch FR, Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry: Friend or Foe?, *Arch Pathol Lab* 2016; 140(4):326-331.
114. Dako. PD-L1 IHC 22C3 PharmDx Interpretation Manual- Gastric or Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Is FDA-Approved for In Vitro Diagnostic Use. 2019. Available online: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29219_pd-l1-ihc-22C3-pharmdx-gastric-interpretation-manual_us.pdf (accessed on 28 November 2021).
115. Dako. PD-L1 IHC 22C3 PharmDX Interpretation Manual- NSCLC- For In Vitro Diagnostic Use. 2018. Available online: <https://usermanual.wiki/m/36cf5deff6015d44ebe696b439deba5ec850657a9b00689e6c52d5bc11706076.pdf> (accessed on 28 November 2021).
116. Davis A, Tinker AV, Friedlander M. "Platinum resistant" ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit? *Gynecol Oncol* 2014;133(3):624-31.
117. Vergote I, De Brabanter J, Fyles A, Bertelsen K, Einhorn N, Sevelde P, et al. Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *Lancet* 2001; 357(9251):176-82.
118. Gilks CB, Ionescu DN, Kalloger SE, Köbel M, Irving J, Clarke B, et al. Cheryl Brown Ovarian Cancer Outcomes Unit of the British Columbia Cancer Agency. Tumor cell type can be reproducibly diagnosed and is of independent prognostic significance in patients with maximally debulked ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2008; 39(8):1239-51.
119. Duggan MA, Anderson WF, Altekruse S, Penberthy L, Sherman ME. The Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program and Pathology: Toward Strengthening the Critical Relationship. *Am J Surg Pathol* 2016; 40(12):e94-e102.
120. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003; 302:643-646.
121. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res* 2015; 75(11):2139-2145.
122. Santoiemma PP, Powell DJ Jr. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2015; 16(6):807-20.
123. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 372:2018-2028.
124. Polioudaki H, Chantziou A, Kalyvianaki K, Malamos P, Notas G, Mavroudis D, et al. Nuclear localization of PD-L1: artifact or reality? *Cell Oncol (Dordr)* 2019; 42(2):237-242.
125. Salmon H, Remark R, Gnjatic S, Merad M. Host tissue determinants of tumour immunity. *Nat Rev Cancer* 2019; 19(4):215-227.
126. Aust S, Felix S, Auer K, Bachmayr-Heyda A, Kenner L, Dekan S, et al. Absence of PD-L1 on tumor cells is associated with reduced MHC I expression and PD-L1 expression increases in recurrent serous ovarian cancer. *Sci Rep* 2017; 7:42929.
127. Paterson AM, Brown KE, Keir ME, Vanguri VK, Riella LV, Chandraker A, et al. The programmed death-1 ligand 1:b7-1 pathway restrains diabetogenic effector T cells in vivo. *J Immunol* 2011; 187(3):1097-105.

128. Chatterjee J, Dai W, Aziz NHA, Teo PY, Wahba J, Phelps DL, et al. Clinical Use of Programmed Cell Death-1 and Its Ligand Expression as Discriminatory and Predictive Markers in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2017; 23:3453-3460.
129. Maine CJ, Aziz NH, Chatterjee J, Hayford C, Brewig N, Whilding L, et al. Programmed death ligand-1 over-expression correlates with malignancy and contributes to immune regulation in ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63(3):215-224.
130. Frigola X, Inman BA, Krco CJ, Liu X, Harrington SM, Bulur PA, et al. Soluble B7-H1: differences in production between dendritic cells and T cells. *Immunol Lett* 2012; 142(1-2):78-82.
131. Heeren M, Punt S, Bleeker M, Gaarenstroom K, Van der Velden J, Kenter G, et al. Prognostic effect of different PD-L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Modern Pathology* 2016; 29:753-763.
132. Takada K, Okamoto T, Shoji F, Shimokawa M, Akamine T, Takamori S, et al. Clinical Significance of PD-L1 Protein Expression in Surgically Resected Primary Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2016; 11:1879-1890.
133. Inman BA, Sebo TJ, Frigola X, Dong H, Bergstralh EJ, Frank I, et al. PD-L1 (B7- H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* 2007; 109:1499-1505.
134. McLaughlin J, Han G, Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, Pelekanou V, Rehman J, et al. Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* 2016; 2:46-54.
135. Shi SJ, Wang LJ, Wang GD, Guo ZY, Wei M, Meng YL, et al. B7-H1 expression is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma and regulates the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells. *PLoS One* 2013; 8(10):e76012.
136. Chen J, Li G, Meng H, Fan Y, Song Y, Wang S, et al. Upregulation of B7-H1 expression is associated with macrophage infiltration in hepatocellular carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61:101-108.
137. Imai Y, Hasegawa K, Matsushita H, Fujieda N, Sato S, Miyagi E, et al. Expression of multiple immune checkpoint molecules on T cells in malignant ascites from epithelial ovarian carcinoma. *Oncology Letters* 2018; 15:6457-6468.
138. Nhokaew W, Kleebkaow P, Chaisuriya N, Kietpeerakool C. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Epithelial Ovarian Cancer: A Comparison of Type I and Type II Tumors. *Asian Pac J Cancer Prev* 2019; 20(4):1161-1169.
139. Chen H, Molberg K, Strickland AL, Castrillon DH, Carrick K, Jiang Q, et al. PD-L1 Expression and CD8+ Tumor-infiltrating Lymphocytes in Different Types of Tubo-ovarian Carcinoma and Their Prognostic Value in High-grade Serous Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2020; 44(8):1050-1060.
140. Wan C, Keany MP, Dong H, Al-Alem LF, Pandya UM, Lazo S, et al. Enhanced Efficacy of Simultaneous PD-1 and PD-L1 Immune Checkpoint Blockade in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancer Res* 2021; 81(1):158-173.
141. Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, Yoshioka Y, Matsumura N, Baba T, et al. PD-L1 on tumor cells is induced in ascites and promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through CTL dysfunction. *Clin Cancer Res* 2013; 19(6):1363-74.
142. D'Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, Rossi E, Capodanno A, Landi L, et al. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2015; 112:95-102.
143. Gaillard SL, Secord AA, Monk B. The role of immune checkpoint inhibition in the treatment of ovarian cancer *Gynecol Oncol Res Pract* 2016; 3:11.

144. Wang Q, Lou W, Di W, Wu X. Prognostic value of tumor PD-L1 expression combined with CD8⁺ tumor infiltrating lymphocytes in high grade serous ovarian cancer. *Int Immunopharmacol* 2017; 52:7-14.
145. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(9):3360-3365.
146. Martin de la Fuente L, Westbom-Fremer S, Arildsen NS, Hartman L, Malander S, Kannisto P, Måsbäck A, Hedenfalk I. PD-1/PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes are prognostically favorable in advanced high-grade serous ovarian carcinoma. *Virchows Arch* 2020; 477(1):83-91.
147. Bekos C, Pils D, Dekan S, Hofstetter G, Horak P, Reinthaller A, et al. PD-1 and PD-L1 expression on TILs in peritoneal metastases compared to ovarian tumor tissues and its associations with clinical outcome. *Sci Rep* 2021; 11(1):6400.
148. Diskin B, Adam S, Cassini MF, Sanchez G, Liria M, Aykut B, et al. PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. *Nat Immunol* 2020; 21(4):442-454.
149. Zhang C, Yang Q. Predictive Values of Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression for Prognosis, Clinicopathological Factors, and Response to Programmed Cell Death-1/Programmed Cell Death-Ligand 1 Inhibitors in Patients With Gynecological Cancers: A Meta-Analysis. *Front Oncol* 2021; 10:572203.
150. Flies DB, Higuchi T, Harris JC, Jha V, Gimotty PA, Adams SF. Immune checkpoint blockade reveals the stimulatory capacity of tumor-associated CD103⁺ dendritic cells in late-stage ovarian cancer. *Oncoimmunology* 2016; (5):8,e1185583,
151. Hoare M, Narita M. The Power Behind the Throne: Senescence and the Hallmarks of Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol* 2018; 2:175-94.
152. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16(6):329-44.
153. Cai M, Hu Z, Liu J, Gao J, Liu C, Liu D, et al. Beclin 1 expression in ovarian tissues and its effects on ovarian cancer prognosis. *Int J Mol Sci* 2014; 15:5292-5303.
154. Ju LL, Zhao CY, Ye KF, Yang H, Zhang J. Expression and clinical implication of Beclin1, HMGB1, p62, survivin, BRCA1 and ERCC1 in epithelial ovarian tumor tissues. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20(10):1993-2003.
155. Iwadata R, Inoue J, Tsuda H, Takano M, Furuya K, Hirasawa A, et al. High expression of SQSTM1/p62 protein is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Acta Histochem. Cytochem* 2014; 47:295-301.
156. Hu Z, Cai M, Deng L, Zhu L, Gao J, Tan M, et al. The fucosylated CD147 enhances the autophagy in epithelial ovarian cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7:82921-82932.
157. Chifenti B, Locci MT, Lazzeri G, Guagnozzi M, Dinucci D, Chiellini F, et al. Autophagy-related protein LC3 and Beclin-1 in the first trimester of pregnancy. *Clin Exp Reprod Med* 2013; 40(1):33-37.
158. Lin HX, Qiu HJ, Zeng F, Rao HL, Yang GF, Kung HF, et al. Decreased expression of Beclin 1 correlates closely with Bcl-xL expression and poor prognosis of ovarian carcinoma. *PLoS One* 2013; 8(4):e60516.
159. Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: A unique autophagy-related protein. *Cell Res* 2007; 17:839-849.
160. Minamoto T, Nakayama K, Nakamura K, Katagiri H, Sultana R, Ishibashi T, et al. Loss of beclin 1 expression in ovarian cancer: A potential biomarker for predicting unfavorable outcomes. *Oncol Lett* 2018; 15(1):1170-1176.

161. Chen X, Sun Y, Wang B, Wang H. Prognostic significance of autophagy-related genes Beclin1 and LC3 in ovarian cancer: a meta-analysis. *J Int Med Res* 2020; 48(11):300060520968299.
162. Carvajal-Hausdorf D, Schalper K.A, Neumeister V, Rimm D.L. Quantitative measurement of cancer tissue biomarkers in the lab and in the clinic. *Lab. Investig* 2015; 95:385-396.
163. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl. Cancer Res* 2015; 4:256-269.
164. Wang X, Du Z, Li L, Shi M, Yu Y. Beclin 1 and p62 expression in non-small cell lung cancer: relation with malignant behaviors and clinical outcome. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(9):10644-52.
165. Zhao Y, Chen S, Gou WF, Xiao LJ, Takano Y, Zheng HC. Aberrant Beclin 1 expression is closely linked to carcinogenesis, differentiation, progression, and prognosis of ovarian epithelial carcinoma. *Tumour Biol* 2014; 35(3):1955-64.
166. Zhan L, Zhang Y, Wang W, Song E, Fan Y, Li J, et al. Autophagy as an emerging therapy target for ovarian carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(50):83476-83487.
167. Yang S, Imamura Y, Jenkins RW, Cañadas I, Kitajima S, Aref A, et al. Autophagy Inhibition Dysregulates TBK1 Signaling and Promotes Pancreatic Inflammation. *Cancer Immunol Res* 2016; 4(6):520-30.
168. Deretic V, Levine B. Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy* 2018; 14(2):243-251.
169. Riffelmacher T, Richter FC, Simon AK. Autophagy dictates metabolism and differentiation of inflammatory immune cells. *Autophagy* 2018; 14(2):199-206.
170. Balar AV, Weber JS. PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: current status and future directions. *Cancer Immunol Immunother* 2017; 66(5):551-564.
171. Dai M, Wei H, Yip YY, Feng Q, He K, Popov V, et al. Long-lasting complete regression of established mouse tumors by counteracting Th2 inflammation. *J Immunother* 2013; 36:248-257.
172. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:59-73.
173. Yang M, Liu P, Wang K, Glorieux C, Hu Y, Wen S, et al. Chemotherapy induces tumor immune evasion by upregulation of programmed cell death ligand 1 expression in bone marrow stromal cells. *Mol Oncol* 2017; 11:358-372.
174. Wennerberg E, Vanpouille-Box C, Bornstein S, Yamazaki T, Demaria S, Galluzzi L. Immune recognition of irradiated cancer cells. *Immunological Reviews* 2017; 280:220-230.
175. Viry E, Paggetti J, Baginska J, Mgrditchian T, Berchem G, Moussay E, et al. Autophagy: an adaptive metabolic response to stress shaping the antitumor immunity. *Biochem Pharmacol* 2014; 92(1):31-42.
176. Xiao X, Dong D, He W, Song L, Wang Q, Yue J, et al. Mismatch repair deficiency is associated with MSI phenotype, increased tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in immune cells in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2018; 149(1):146-154.
177. Ali M, Matboli M, Tarek M, Reda M, Kamal K, Nouh M, et al. Epigenetic regulation of immune checkpoints: another target for cancer immunotherapy? *Immunotherapy* 2017; 9(1):99-108.
178. Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18(3):197-218.

Spisak skraćenica:

EOC- Epitelni ovarijalni karcinom
APT- Atipično proliferišući tumor
BOT- Benigni ovarijalni tumor
FIGO- International Federation of Gynecology and Obstetrics
DFS- Disease Free Survival
BRCA 1, BRCA 2- Breast cancer 1 i 2
HGSC- High grade serous carcinoma
LGSC- Low grade serous carcinoma
FOXM1- Forkhead box protein M1
CA125- Cancer Antigen 125
HE4- Human Epididymis Protein 4
EORTC- Evropska organizacija za istraživanje i tretman karcinoma
EMA- European Medicines Agency
PARP- poly ADP-ribose polymerase
MHC I, MHC II- molekuli histokompatibilnosti I i II
Treg- T regulatorni limfociti
MDSC- Myeloid derived suppressor cells
NK ćelije- Natural killer cells
IL- 4- Interleukin 4
IL- 6- Interleukin 6
IL-8- Interleukin 8
IL-10- Interleukin 10
IL-13- Interleukin 13
TGF- β - Tumor growth factor β
VEGF- Vascular endothelial growth factor
TIL- Tumor infiltrišući limfociti
CTLA 4- Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4
PD-1- Programmed death 1
PD-L1- Programmed death ligand 1
PI3K- Phosphatidylinositol 3- kinase
INF- γ - Interferon gama
DNK- Deoksiribonukleinska kiselina
TMA- Tissue microarray
TAM- Tumor udruženi makrofagi
TBK1- Tank binding kinase 1
JAK- Janus kinase
mTOR- Mammalian target of rapamycin
ULK1 i ULK2- Unc-51-like kinases 1 i 2
AMPK- AMP-Activated protein kinase
PIK3C3- Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3
MAP1LC3- Microtubule-associated protein 1 light chain 3
PI(3)P- Phosphatidylinositol 3-phosphate
LIF- leukemia inhibitory factor
IL1 β - Interleukin 1 β
CXCL8- Chemokine (C-X-C motif) ligand 8
FAM3C- Family with sequence similarity 3, member C
DKK3- Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3

tBregs- Tumor-induced B regulatory cells
LAG3- Lymphocyte activation gene 3
TIM-3- T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
BTLA- B and T lymphocyte attenuator
CAR- Chimeric Antigen Receptor
IDO- Indoleamine 2,3-dioxygenase
COX-1 i 2- Cyclooxygenases 1, 2
VCAM-1- Vascular cell adhesion molecule 1
CAFs- Cancer Associated Fibroblasts
HIF-1 α - Hypoxia-Induced Factor-1 alpha
ARH1- Aplasia Ras Homolog member I
MARCH5- Membrane-Associated RING-CH
FAK- Focal Adhesion Kinase

Biografija:

Dr Ljubiša Jovanović, rođen je 18.03.1985. u Jagodini. Medicinski fakultet u Beogradu završio je 2010. godine sa prosekom ocena 9,73. Specijalizaciju iz patologije završio je na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu, 2016. godine, sa odličnom ocenom. Specijalističke akademske studije modul „Humana reprodukcija“ završio je 2019. godine sa prosekom ocena 9,64 i odbranjenom temom „Mikroskopske promene u biospijama testisa bolesnika sa opstruktivnom i neopstruktivnom azospermijom“, pod mentorstvom Prof. dr Svetislava Tatića. Užu specijalizaciju iz oblasti Medicinske citologije završio je 2020. godine sa ocenom deset (10) i odbranjenom temom „Ekspresija markera imunosupresije (PD-L1) u ćelijama ovarijalnog karcinoma u peritonealnoj lavaži u poređenju sa ekspresijom u primarnom tumoru i u peritonealnim metastatskim depozitima“, pod mentorstvom Doc. dr Radmile Janković. Tema doktorske disertacije „Ekspresija markera imunosupresije u epitelnim tumorima jajnika i njihova povezanost sa markerima autofagije“ je odobrena 2020. godine. Zaposlen je u Službi za patologiju i medicinsku citologiju Klinike za ginekologiju i akušerstvo, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Ljubiša Jovanović je izabran u naučno zvanje istraživača saradnika.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Љубиша Јовановић

Број индекса: НРН 02/15

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Експресија маркера имуносупресије у епителним туморима јајника и њихова повезаност са маркерима аутофагије“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 01.12.2021.

Љубиша Јовановић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Љубиша Јовановић

Број индекса: НРН 02/15

Студијски програм: Хумана репродукција

Наслов рада: „Експресија маркера имуносупресије у епителним туморима јајника и њихова повезаност са маркерима аутофагије“

Ментор: Доц. др Радмила Јанковић

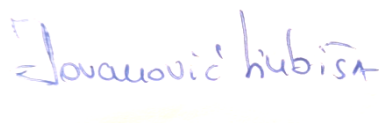
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 01.12.2021.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Експресија маркера имуносупресије у епителним туморима јајника и њихова повезаност са маркерима аутофагије“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 01.12.2021.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.