

# EKSPRESIJA I ZNAČAJ PD-L1 MOLEKULE U NE-SITNOSTANIČNOM KARCINOMU PLUĆA

---

**Pupić-Bakrač, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:582935>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-26**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI**  
**SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE**

**Petra Pupiće-Bakrač**

**EKSPRESIJA I ZNAČAJ PD-L1 MOLEKULE U**  
**NE-SITNOSTANIČNOM KARCINOMU PLUĆA**

**Diplomski rad**

**Rijeka, 2018.**

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Petra Pupić-Bakrač

EKSPRESIJA I ZNAČAJ PD-L1 MOLEKULE U  
NE-SITNOSTANIČNOM KARCINOMU PLUĆA

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

Mentor rada: Doc.dr.sc. Koviljka Matušan Ilijaš

Diplomski rad ocijenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_,

pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Ksenija Jurinović
2. Izv. prof. dr. sc. Sanja Štifter
3. Doc. dr. sc. Emina Babarović

Rad sadrži: 48 stranica, 12 slika, 5 tablica, 61 literaturni navod, 4 dodatka..

## **ZAHVALA**

*Najprije veliko Hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Kobiljki Matušan Ilijaš na bezgraničnome strpljenju, savjetima i podršci prilikom izrade ovog diplomskog rada kao i za uloženo vrijeme i razgovore uz koje bi moja promišljanja i ideje dobivale na značajnosti te što me vodila kroz široki svijetu znanstvenog rasuđivanja.*

*Zahvalu upućujem i svim profesorima i asistentima Katedre za opću patologiju i patološku anatomiju, a posebno prof. dr. sc. Kseniji Jurinović kao svojoj prvoj učiteljici uz koju sam spoznala ljepotu znanstveno-istraživačkog rada, te kao demonstrator Katedre upoznala radost dijeljenja znanja s drugim kolegama.*

*Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima i sestri jer su uvijek, bez zadržke, bili uz mene, donosili razumijevanje, mir i strpljenje kada mi je bilo najpotrebnije.*

*Zahvaljujem svojim prijateljima na brojnim zajedničkim trenucima, razumijevanju i na svim lijepim iskustvima u kojima smo skupa uživali, ali i onim manje lijepim zbog kojih smo skupa odrastali.*

*U konačnici, ovim putem želim zahvaliti i svim djelatnicima Medicinskog fakulteta u Rijeci, uz koje sam usvajala znanja i vještine potrebne za obavljanje jednog od najplemenitijih životnih poziva, poziva doktora medicine*

## **PROSLOV**

Diplomski rad napisan je analizom podataka sakupljenih u sklopu projekta „Uloga osteopontina u progresiji tumora“, voditeljice prof. dr. sc. Ksenije Jurinović na Zavodu za patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

## SADRŽAJ

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | UVOD .....  | 1  |
| 1.1.   | Tumori pluća.....   | 1  |
| 1.1.1. | Epidemiologija i etiologija tumora pluća .....  | 1  |
| 1.1.2. | Klinička slika tumora pluća.....  | 2  |
| 1.1.3. | Dijagnostika tumora pluća .....   | 3  |
| 1.1.4. | Patohistološka klasifikacija i određivanje molekularnog profila karcinoma pluća .....       | 4  |
| 1.1.5. | Određivanje stadija i standardno liječenje tumora pluća .....                               | 9  |
| 1.2.   | PD-L1 .....   | 12 |
| 1.2.1  | Molekularna biologija i funkcija PD-L1 u tumorskom mikrookolišu .....                       | 12 |
| 1.2.2. | Ekspresija PD-L1 u tumorskom tkivu i klinički značaj .....                                  | 15 |
| 1.2.3. | Ciljana terapija NSSKP-a i individualizirani pristup liječenju .....                        | 16 |
| 2.     | CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....   | 21 |
| 3.     | ISPITANICI, MATERIJALI I POSTUPCI .....   | 22 |
| 3.1.   | Ispitanici i materijali .....   | 22 |
| 3.2.   | Postupci .....  | 23 |
| 3.2.1. | Određivanje prognostičkih faktora .....   | 23 |
| 3.2.2. | Imunohistokemijsko bojanje .....  | 23 |
| 3.2.3. | Određivanje proliferativne aktivnosti tumorskih stanica .....                               | 24 |
| 3.2.4. | Određivanje ekspresije PD-L1 proteina .....   | 24 |
| 3.2.5. | Statistička obrada podataka .....   | 25 |
| 4.     | REZULTATI.....  | 26 |
| 4.1.   | Kliničkopatološki podaci .....  | 26 |
| 4.2.   | Imunohistokemijsko PD-L1 bojanje.....   | 27 |
| 4.3.   | Povezanost PD-L1 ekspresije s kliničkopatološkim parametrima i preživljenjem bolesnika..... | 29 |
| 5.     | RASPRAVA.....   | 32 |
| 6.     | ZAKLJUČCI .....   | 37 |
| 7.     | SAŽETAK.....  | 38 |
| 8.     | SUMMARY .....   | 39 |
| 9.     | LITERATURA.....   | 40 |
| 10.    | ŽIVOTOPIS .....   | 48 |

## POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

**AJCC** - American Joint Committee on Cancer

**ALK** - anaplastične limfomske kinaze (od *eng. anaplastic lymphoma kinase*)

**CTL** - citotoksični T limfociti

**DDR2** - diskoidin receptor smrti-2 (od *eng. discoidin death receptor 2*)

**DFS** - duljina preživljenja bez bolesti (od *eng. disease free survival*)

**EGFR** - receptor epidermalnog faktora rasta (od *eng. epidermal growth factor receptor*)

**FDA** - Američka Agencija za hranu i lijekove (od *eng. American food and drug administration*)

**FEV1** - forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi

**FGFR -1**- fibroblastni faktora rasta-1 (od *eng. fibroblast growth factor receptor-1*)

**GM-CSF** - faktor stimulacije granulocitnih i makrofagnih kolonija (od *eng. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

**HE** - bojenje hematoksilinom i eozinom

**HRCT** - kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije (od *eng. high-resolution computed tomography, HRCT*)

**H-skor** - histološki skor (od *eng. histological score*)

**IASLC** - International Association for the study of Lung Cancer Publication

**IFN- $\gamma$**  - interferon- $\gamma$

**IH** - imunohistokemijska metoda

**IS** - intersticijske stanice

**KBC** - Klinički bolnički centar

**KOPB** - kronična opstuktivna plućna bolest

**LPS** - lipopolisaharid

**MHC** - kompleks histokompatibilnosti (od *eng. major histocompatibility complex*)

**NCCN** - National Comprehensive Cancer Network

**NGS** - sekvenciranje genoma nove generacije (odeng. *next generation sequencing*)

**NOS** - karcinom ne-malih stanica koji se ne može pobliže opisati

**NSSKP** - ne-sitnostanični karcinom pluća

**PD-1** - receptor programirane stanične smrti-1 (od eng. *programmed death receptor-1*)

**PD-L1** - ligand programirane stanične smrti-1 (eng. *programmed death ligand-1*)

**PD-L2** - ligand programirane stanične smrti-2 (od eng. *programmed death ligand-2*)

**PFS** - duljina preživljenja bez progresije (od eng. *progression-free survival*)

**RFS** - duljina preživljenja bez relapse (odeng. *relaps free survival*)

**RH** - Republika Hrvatska

**SSKP** - sitnostanični karcinom pluća

**TCR** - T-stanični receptor

**TGF- $\beta$**  - tumorski faktor rasta  $\beta$  (od eng. *tumor growth factor-  $\beta$* )

**TIL** - tumor infiltrirajući limfociti

**TKI** - tirozin-kinazni inhibitori

**TMA** - tumorska mikroareja (odeng. *tissue microarray*)

**TNF-  $\alpha$**  - faktor tumorske nekroze  $\alpha$  (od eng. *tumor necrosis factor-  $\alpha$* )

**TS** - tumorske stanice

**TTF-1** - tireoidni transkripcijski faktor-1 (od eng. *thyreoid transcriptional factor-1*)

**VEGF** - vaskularni endotelni faktor rasta (od eng. *vascular endothelial growth factor*)



# **1. UVOD**

## **1.1. Tumori pluća**

### **1.1.1. Epidemiologija i etiologija tumora pluća**

Tumori pluća vodeći su uzrok smrti u svijetu. Podaci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo zloćudne novotvorine dušnika i pluća stavljaju na treće mjesto uzroka smrti u Republici Hrvatskoj (RH) u 2016. godini dok sve novotvorine čine 27,9% udjela uzroka smrti iste godine.[1]

Novotvorine su zbog produljenja životnog vijeka i promjena životnog stila i navika postale prava pandemijska bolest. Incidencija zloćudnih novotvorina traheje, dušnika i pluća pokazuje trend rasta posljednjih godina u RH. Prema podacima iz 2015. godine, koliko je čest taj tumor, govori činjenica da je prema postotku pojavnosti na prvom mjestu u muškaraca te na trećem mjestu kod žena.[2]

Sama činjenica da je petogodišnje preživljenje za većinu tumora pluća izrazito nisko, npr. za karcinome pluća ne-malih stanica (NSSKP) je jedva nešto više od 15% govori da je to jedan javnozdravstveni problem kojeg treba adresirati i promicati aktivnosti kako bi se smanjili čimbenici rizika u populaciji.[3]

Čimbenici rizika za nastanak ovih tumora su različiti, ali ono što se uvijek naglašava je pušenje gdje treba imati na umu pasivno pušenje, koje također povisuje rizik. U prilog tome govore i rezultati američkog istraživanja iz 2001. godine gdje je opisano povećanje mortaliteta od tumora pluća kod žena za 600% od 1950. godine upravo kada je trend pušenja bio u porastu unutar te populacije.[4]

U uskoj vezi s pušenjem i nastankom tumora pluća je i postojanje kronične opstruktivne bolesti pluća (KOPB). Komparativna studija koja je istraživala pojavnost KOPB-a među novootkrivenim tumorima pluća u pušača i ne pušača prikazala je rezultate da je u pušača prevalencija bila 50%, a u nepušača svega 8%.[5] KOPB 6 puta je češći među pušačima

oboljelima od ne-sitnostaničnog karcinoma pluća nego u pušača koji nemaju karcinom pluća.[5] Karcinom pluća je 4-5 puta češći kod pacijenata s KOPB-om. [6] Trinaestogodišnja britanska retrospektivna studija provedena na preko 4 milijuna ispitanika s tumorima pluća pokazala je da je trogodišnje preživljenje u pacijenata s KOPB-om duplo manje nego u onih bez tog komorbiditeta (15% naspram 26%;  $p < 0.01$ ).[7]

Drugi nepromjenjivi čimbenici rizika su (starija) životna dob, karcinom pluća u obiteljskoj anamnezi i genetska opterećenost.[8] Ostali čimbenici rizika na koje možemo utjecati su različite imunodeficijencije, na prvom mjestu HIV infekcija, kronične upalne bolesti pluća, nadalje kod osoba koje su primale terapiju zračenjem nakon resekcije karcinoma dojke značajno se povećava rizik te neki okolišni faktori kao što su izloženost azbestu, kadmiju, niklu, arsenu i radonu od kojih se većina može naći u smogu također mogu potaknuti nastanak mutacija i dovesti do karcinoma.[8,9] Kao i kod drugih tumora treba napomenuti kumulativni i sinergistički učinak ovih čimbenika gdje bilo koji navedeni kombiniran s pušenjem dodatno povećava rizik.

### **1.1.2. Klinička slika tumora pluća**

Klinička slika tumora pluća varira ovisno o lokalizaciji tumora u odnosu na velike bronhe, lokalnoj invaziji, te metaboličkoj aktivnosti tumorskog tkiva.[10] Ukoliko tumor pritišće na velike bronhe ili se nalazi unutar njih izaziva iritaciju sluznice te se manifestira kroničnim kašljem, a zbog razaranja sluznice te posljedičnog krvarenja dolazi do hemoptize.[10]

Kronični kašalj i hemoptiza jedni su od češćih simptoma zbog kojih se pacijenti, s još nedijagnosticiranim tumorom pluća, obraćaju svome liječniku. Osim toga može doći do nastanka brohiektazija, ili ukoliko je opstruiran lumen bronha u velikom postotku do atelektaze pluća distalno od tog mjesta. Širenje tumora prema susjednim strukturama može

dovesti do sindroma gornje šuplje vene, pleuritisa s ili bez izljeva, a ukoliko se tumor nalazi u apikalnom dijelu pluća može dovesti do Hornerovog sindroma (ptoza, mioza, enoftalmus te anhidroza) ili do ipsilateralne slabosti ruke zbog infiltracije brahialnog plexusa [10].

Metabolička aktivnost tumorskih stanica veća je nego u zdravih stanica što rezultira povećanim potrebama tumorskih stanica za nutrijentima, u prvom redu glukozom, a posljedično tome do simptoma kroničnog umora, slabosti, mršavljenja, gubitka teka i sl. Tumori pluća mogu lučiti različite hormone, kao što su antidiuretski, ali i druge biološki aktivne tvari, te dovesti do paraneoplastičnog sindroma što se događa u oko 5% pacijenata, najčešće kod sitnostaničnog karcinoma pluća, no može se pojaviti kod svih vrsta tumora pluća. [10] Brzi rast tumora i adhezivnost tumorskih stanica dovode do limfogenog ili hematogenog rasapa. Limfnim širenjem, tumori pluća, invadiraju traheobronhalne, cervikalne, aksilarne, supraklavikularne ili mezenterijalne limfne čvorove.[10] Hematogene metastaze najčešće dopijaju u jetru, nadbubrežnu žljezdu, mozak, kosti ili bubrege. [10]

### **1.1.3. Dijagnostika tumora pluća**

Anamneza i klinička slika dati će nam informacije koje nas mogu usmjeriti da posumnjamo na tumor pluća. Dominantno se radi u slikovnim metodama- u prvom redu radiogramu srca i pluća gdje se mogu vidjeti multiple ili solitarne nodularne sjene plućnog parenhima, proširenje mediastinuma, atelektaza pluća, uvećanje hilusa pluća, nerazjašnjeno zadebljanje pleure ili pleuralni izljev.[11] Ove promjene nisu specifične za tumor pluća, ali će nam dati povoda za dodatnu obradu. Specifičnije pretrage koje možemo ordinirati su kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije (eng. high-resolution computed tomography, HRCT) koja će pokazati karakteristične nalaze i može potvrditi dijagnozu. [11] Definitivnu dijagnozu karcinoma pluća možemo dobiti citološkom ili patohistološkom analizom tumora putem transtorakalne biopsije pod kontrolom CT-a, zatim tijekom bronhoskopije ili temeljem

citološke analize tumorskih stanica pleuralnog izljeva, metastatskog limfnog čvora te eventualno iz sputuma pacijenta. [11] Ovi se uzorci analiziraju u patološkom ili citološkom laboratoriju te nalaz koji uslijedi o vrsti tumora i njegovim dodatnim karakteristikama temeljem imunohistokemijske (IH) i molekularne analize postaje krajnja dijagnoza prema kojoj se kasnije kroji liječenje.

#### **1.1.4. Patohistološka klasifikacija i određivanje molekularnog profila karcinoma pluća**

Karcinomi pluća, iz patohistološkog aspekta, dijele se u karcinome malih i ne-malih stanica (Slika 1).

**TABLE 1. 2015 WHO Classification of Lung Tumors<sup>a,b,c</sup>**

| Histologic Type and Subtypes                                 | ICDO Code           |
|--|---------------------|
| <b>Epithelial tumors</b>                                     |                     |
| Adenocarcinoma   | 8140/3              |
| Lepidic adenocarcinoma <sup>d</sup>                          | 8250/3 <sup>d</sup> |
| Acinar adenocarcinoma  | 8551/3 <sup>d</sup> |
| Papillary adenocarcinoma                                     | 8260/3              |
| Micropapillary adenocarcinoma <sup>d</sup>                   | 8265/3              |
| Solid adenocarcinoma   | 8230/3              |
| Invasive mucinous adenocarcinoma <sup>d</sup>                | 8253/3 <sup>d</sup> |
| Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma       | 8254/3 <sup>d</sup> |
| Colloid adenocarcinoma                                       | 8480/3              |
| Fetal adenocarcinoma   | 8333/3              |
| Enteric adenocarcinoma <sup>d</sup>                          | 8144/3              |
| Minimally invasive adenocarcinoma <sup>d</sup>               |                     |
| Nonmucinous  | 8256/3 <sup>d</sup> |
| Mucinous   | 8257/3 <sup>d</sup> |
| Preinvasive lesions  |                     |
| Atypical adenomatous hyperplasia                             | 8250/0 <sup>d</sup> |
| Adenocarcinoma in situ <sup>d</sup>                          |                     |
| Nonmucinous  | 8250/2 <sup>d</sup> |
| Mucinous   | 8253/2 <sup>d</sup> |
| Squamous cell carcinoma                                      | 8070/3              |
| Keratinizing squamous cell carcinoma <sup>d</sup>            | 8071/3              |
| Nonkeratinizing squamous cell carcinoma <sup>d</sup>         | 8072/3              |
| Basaloid squamous cell carcinoma <sup>d</sup>                | 8083/3              |
| Preinvasive lesion   |                     |
| Squamous cell carcinoma in situ                              | 8070/2              |
| Neuroendocrine tumors  |                     |
| Small cell carcinoma   | 8041/3              |
| Combined small cell carcinoma                                | 8045/3              |
| Large cell neuroendocrine carcinoma                          | 8013/3              |
| Combined large cell neuroendocrine carcinoma                 | 8013/3              |
| Carcinoid tumors   |                     |
| Typical carcinoid tumor                                      | 8240/3              |
| Atypical carcinoid tumor                                     | 8249/3              |
| Preinvasive lesion   |                     |
| Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia | 8040/0 <sup>d</sup> |
| Large cell carcinoma   | 8012/3              |
| Adenosquamous carcinoma                                      | 8560/3              |
| Sarcomatoid carcinomas                                       |                     |
| Pleomorphic carcinoma  | 8022/3              |
| Spindle cell carcinoma                                       | 8032/3              |
| Giant cell carcinoma   | 8031/3              |
| Carcinosarcoma   | 8980/3              |
| Pulmonary blastoma   | 8972/3              |
| Other and Unclassified carcinomas                            |                     |
| Lymphoepithelioma-like carcinoma                             | 8082/3              |
| NUT carcinoma <sup>d</sup>                                   | 8023/3 <sup>d</sup> |
| Salivary gland-type tumors                                   |                     |
| Mucoepidermoid carcinoma                                     | 8430/3              |
| Adenoid cystic carcinoma                                     | 8200/3              |
| Epithelial-myoepithelial carcinoma                           | 8562/3              |
| Pleomorphic adenoma  | 8940/0              |

(Continued)

**TABLE 1. (Continued)**

| Histologic Type and Subtypes  | ICDO Code           |
|---|---------------------|
| <b>Papillomas</b>   |                     |
| Squamous cell papilloma   | 8052/0              |
| Exophytic   | 8052/0              |
| Inverted  | 8053/0              |
| Glandular papilloma   | 8260/0              |
| Mixed squamous and glandular papilloma  | 8560/0              |
| <b>Adenomas</b>   |                     |
| Sclerosing pneumocytoma <sup>d</sup>  | 8832/0              |
| Alveolar adenoma  | 8251/0              |
| Papillary adenoma   | 8260/0              |
| Mucinous cystadenoma  | 8470/0              |
| Mucous gland adenoma  | 8480/0              |
| <b>Mesenchymal tumors</b>   |                     |
| Pulmonary hamartoma   | 8992/0 <sup>d</sup> |
| Chondroma   | 9220/0              |
| PEComatous tumors <sup>e</sup>  |                     |
| Lymphangioliomyomatosis   | 9174/1              |
| PEComa, benign <sup>e</sup>   | 8714/0              |
| Clear cell tumor  | 8005/0              |
| PEComa, malignant <sup>e</sup>  | 8714/3              |
| Congenital peribronchial myofibroblastic tumor  | 8827/1              |
| Diffuse pulmonary lymphangiomatosis   |                     |
| Inflammatory myofibroblastic tumor  | 8825/1              |
| Epithelioid hemangioendothelioma  | 9133/3              |
| Pleuropulmonary blastoma  | 8973/3              |
| Synovial sarcoma  | 9040/3              |
| Pulmonary artery intimal sarcoma  | 9137/3              |
| Pulmonary myxoid sarcoma with <i>EWSR1-CREB1</i> translocation <sup>e</sup>             | 8842/3 <sup>d</sup> |
| Myoepithelial tumors <sup>e</sup>   |                     |
| Myoepithelioma  | 8982/0              |
| Myoepithelial carcinoma   | 8982/3              |
| <b>Lymphohistiocytic tumors</b>   |                     |
| Extranodal marginal zone lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) | 9699/3              |
| Diffuse large cell lymphoma   | 9680/3              |
| Lymphomatoid granulomatosis   | 9766/1              |
| Intravascular large B cell lymphoma <sup>d</sup>  | 9712/3              |
| Pulmonary Langerhans cell histiocytosis   | 9751/1              |
| Erdheim-Chester disease   | 9750/1              |
| <b>Tumors of ectopic origin</b>   |                     |
| Germ cell tumors  |                     |
| Teratoma, mature  | 9080/0              |
| Teratoma, immature  | 9080/1              |
| Intrapulmonary thymoma  | 8580/3              |
| Melanoma  | 8270/3              |
| Meningioma, NOS   | 9530/0              |
| <b>Metastatic tumors</b>  |                     |

<sup>a</sup>The morphology codes are from the ICDO.<sup>2</sup> Behavior is coded /0 for benign tumors, /1 for unspecified, borderline or uncertain behavior, /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia, and /3 for malignant tumors.

<sup>b</sup>The classification is modified from the previous WHO classification<sup>3</sup> taking into account changes in our understanding of these lesions.

<sup>c</sup>This table is reproduced from the 2015 WHO Classification by Travis et al.<sup>1</sup>

<sup>d</sup>These new codes were approved by the International Agency on Cancer Research/WHO Committee for ICDO.

<sup>e</sup>New terms changed or entities added since 2004 WHO Classification.<sup>3</sup>

LCNEC, large cell neuroendocrine carcinoma, WHO, World Health Organization; ICDO International Classification of Diseases for Oncology.

## Slika 1. Patohistološka klasifikacija tumora pluća (u cijelosti preuzeto iz [40])

**Sitnostanični karcinomi pluća (SSKP)** karakterističnog su patohistološkog izgleda, već se na standardnom hematoksilin-eozin (HE) bojenju relativno lako prepoznaje slika malih stanica s izrazito malo citoplazme. Često raste kao solidna masa koja infiltrira okolno tkivo bronha u kojem nastaje te se u velikom broju slučajeva nađu obilni areali nekroze i/ili

krvarenja. Naime ova je vrsta tumora izrazito agresivna te se u trenutku dijagnoze u 2 od 3 pacijenta nađu udaljene metastaze. Snažno je povezan s pušenjem.[10]

**Ne-sitnostanični karcinomi pluća (NSSKP)** heterogena su skupina tumora. Razlog ovakve podjele je taj što ova skupina tumora ukoliko su slabije diferencirani pokazuju sličnu morfologiju na standardnom HE bojenju dok s druge strane imaju različitu morfologiju od SSKP. U ovu skupinu spadaju planocelularni, adenokarcinomi, krupnostanični karcinomi te drugi rjeđi tipovi. Ukoliko su dobro diferencirani, bojenje hematoksilinom i eozinom (HE) dostatno je za postavljanje dijagnoze. Znak diferencijacije planocelularnih karcinoma je postojanje rožnatih perli odnosno nakupina roževine (prava keratinizacija ili parakeratoza (postojanje jezgara u roževini)) unutar nakupina tumorskih stanica. Uz to u korist planocelularnih karcinoma ide i slika pločaste diferencijacije i stratifikacije tumorskog epitela s vidljivim procesom ulaganja keratina unutar stanica. Slojevi koji se mogu vidjeti su bazaloidne stanice (oskudnije i tamnije citoplazme, veće jezgre, lokalizacije uz bazalnu membranu), akantociti (veće stanice, poligonalne, gusto zbijene) te daljnjim ulaganjem keratina njima se smanjuje jezgra dok ne postanu snažno eozinofilne s izrazito bazofilnim tragovima jezgre ili bez nje. Što se tiče adenokarcinoma - može se vidjeti žljezdana diferencijacija u vidu stvaranja acinusa, kribriformnih formacija, papila, mikropapila i sl., također se može naći specifičan tip širenja ovog tumora, a to je lepidički način rasta (tumorske stanice oblažu alveole i na taj se način šire okolnim tkivom). Ove značajke nisu patognomonične za ovu vrstu NSSKP no govore u prilog adenokarcinoma te se daljnje imunohistokemijsko i molekularno testiranje može usmjeriti prema ovom patohistološkom tipu. Ukoliko morfologijom ne možemo utvrditi porijeklo tumorskih stanica, služimo se specifičnim imunohistokemijskim biljezima za adeno odnosno planocelularni karcinom. U tu svrhu u prilog adenokarcinoma pluća ide ekspresija TTF-1 (eng. thyreoid transcriptional factor-1) i napsina A na tumorskim stanicama, a u prilog primarnog planocelularnog

karcinoma p63 i p40 pozitivno imunohistokemijsko bojenje istih.[8]

Pošto su karcinomi heterogeno tkivo s različitim staničnim klonovima, često se dogodi da su neki tumori pozitivni na biljege i za adeno i za planocelularni karcinom. Tada prema smjernicama NCCN, ukoliko je tumorsko tkivo p63 i TTF-1 pozitivno klasificira se kao adenokarcinom, a ukoliko su TTF-1 i p40 istovremeno eksprimirani daje se dijagnoza karcinoma ne-malih stanica koji se ne može pobliže opisati (NOS).

Bez obzira na sam patohistološki tip NNSKP-a, od interesa je utvrditi postoji li mutacija u nekom od onkogeni. Ovaj korak, važan je za onkologe kasnije pri izboru terapije budući da uz klasičnu kemo i radio terapiju danas imamo na raspolaganju brojne biološke lijekove koji imaju manje nuspojava te oboljelima produžavaju život

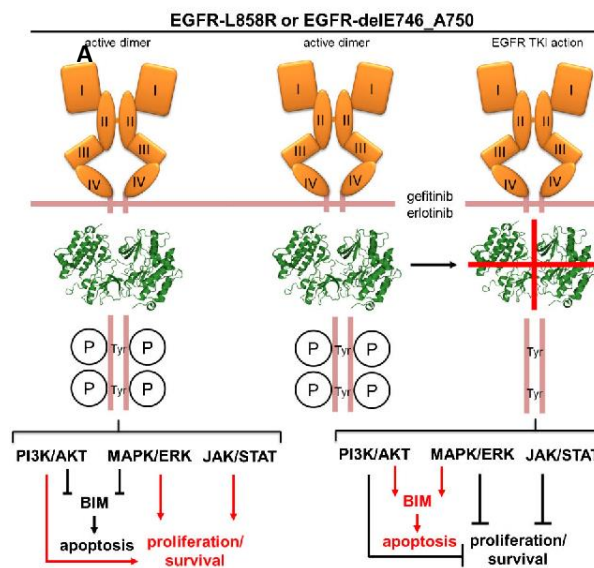
Rutinsko testiranje tumorskog tkiva NNSKP uključuje detektiranje mutacija receptora epidermalnog faktora rasta (eng. epidermal growth factor receptor, EGFR) te anaplastične limfomske kinaze (eng. anaplastic lymphoma kinase, ALK). Mutacija EGFR gena najčešće je detektirana mutacija u NNSKP. [12] Ukoliko pacijent ima ove mutacije prva linija terapije postaje biološka terapija koja blokira ove imunološke putove te su istraživanja pokazala dramatični odgovor pacijenata na ovu terapiju i značajno produženje preživljenja bez progresije (eng. progression-free survival, PFS).[13]

**EGFR** receptor pripada tirozin kinaznoj obitelji s ekstracelularnom ligand vezujućom domenom, i intracelularnim tirozin kinaznim dijelom.[13] Aktivacija receptora pokreće kaskadni intracelularni put koji pojačava mitotsku aktivnost stanice, produžuje njeno preživljavanje te potiče angiogenezu i migraciju stanica u smislu metastaziranja (Slika 2).[14]

Gen koji kodira EGFR nalazi se na sedmom kromosomu, lokusu 7p11.2, a sastoji se od 30 egzona. [15] Najčešće je mutiran u adenokarcinomima. Budući da se radi o aktivirajućim mutacijama receptora, za liječenje NNSKP koriste se tirozin kinazni inhibitori koji

deaktivacijom receptora pokreću suprotne unutarstanične puteve koji rezultiraju apoptozom stanice (Slika 2).[14,16]

Preko 90% mutacija gena za EGFR nalaze se na egzonu 19 i 21 u vidu delecija jednog nukleotida na egzonu 19, i točkaste mutacije gdje se lizin zamjenjuje valinom na egzonu 21.[13] Pacijenti s ovim mutacijama u 70% slučajeva dobro reagiraju na terapiju tirozin kinaznim inhibitorima.[17]



**Slika 2. Mehanizam aktivacije unutarstaničnih puteva putem EGFR receptora i njihov učinak na stanicu. A-supstitucijska mutacija (lizin→ arginin), B-delecija jednog nukleotidaegzona 19, C-mehanizam djelovanja tirozin-kinaznih inhibitora ( u cijelosti preuzeto iz [16])**

Pojavnost mutacija ovog receptora pokazuje varijabilnost unutar različitih populacija.[13] U skupini istočnih Azijata oboljelih od adenokarcinoma koji su ili malo pušili ili su bili nepušači zabilježena je višestruko veća pojavnost ovih mutacija (50-60%) u odnosu na prosječnu učestalost od 15% u ne-Azijskim zemljama.[13]

**ALK** mutacija nešto je rjeđa u populaciji. Češće je prisutna u adenokarcinomima, kod mlađih ljudi, ljudi koji su malo ili nisu pušili te u bijelaca.[14] Radi se o translokacijskoj mutaciji na p kraku kromosoma 2 gdje zbog translokacije dolazi do stvaranja fuzijskog EML4-ALK gena



koji rezultira stvaranjem kimeričnog proteina koji aktivira istovjetne unutarstanične signalne puteve kao i EGFR rezultirajući istim učinkom na tumorogenezu.[14]

Od ostalih mutacija u NSSKP-u značajna je mutacija KRAS proteina. Radi se o enzimu iz RAS obitelji gvanozin trifosfataza koji je dio signalnog puta MAPK/ERK kojeg, između ostalih, pokreću EGFR i ALK mutacije.[14] Ova činjenica objašnjava zašto nekada pacijenti ne reagiraju povoljno na lijekove usmjerene na EGFR ili ALK mutirane proteine.

Napretkom tehnologije i različitih molekularnih metoda, znanje o ovim i drugim mutacijama brzo se proširuje, a liječenje pacijenata sve je uspješnije.

U adenokarcinomima, uz već spomenute, uočene su mutacije HER2, PIK3CA, BRAF i MET gena te translokacije koje aktiviraju odnosno formiraju ROS1 i RET onkogene.[14] U karcinomima pločastih stanica nedavno su detektirane mutacije fibroblastnog faktora rasta-1 (eng. fibroblast growth factor receptor-1, FGFR1), DDR2 receptora (eng. discoidin death receptor 2), te amplifikacije PI3KCA gena.[14] Ove također potiču karcinogenezu i metastaziranje tumora, no za sada nisu uvrštene u rutinsku patohistološku dijagnostičku obradu.

### **1.1.5. Određivanje stadija i standardno liječenje tumora pluća**

Određivanje stadija proširenosti bolesti prvi je korak nakon postavljanja definitivne dijagnoze karcinoma pluća. Stadij bolesti osnova je za formiranje strategije liječenja, ali i procjenjivanje preživljenja pacijenta. Stupnjevanje bolesti danas se određuje korištenjem TNM modela, točnije za NSSKP, trenutno je aktualno sedmo izdanje smjernica za procjenu TNM stadija iz 2009. godine propisano od strane AJCC (eng. American Joint Committee on Cancer). TNM je zapravo akronim za tumor, nodus (limfni čvor) i metastazu, te se posebno evaluira svaka od sastavnica i pridodaje im se broj koji označava proširenost. Puno je mogućih

kombinacija nalaza, pošto svako slovo može imati do 4 stupnja, pa se zbog toga uvelo i stupnjevanje stadija po brojevima I-IV prema utvrđenim TNM deskriptorima. (Dodatak 1- TNM klasifikacija i utvrđivanje stadija NSSKP-a) Svaki stadij ima svoje prognostičko značenje te veći stadij označava i lošiju prognozu, a s druge strane bitno je i pri planiranju liječenja. U Tablici 1 ukratko je prikazan pregled terapijskih mogućnosti za svaki od stadija prema smjernicama NCCN-a (eng. National Comprehensive Cancer Network) iz 2017. godine. Sama strategija liječenja vrlo je detaljno razrađena u smjernicama i kao takva predstavlja vrlo složeni proces koji zahtijeva redovitu reevaluaciju stadija proširenosti bolesti te prilagodbu plana liječenja. Upravo iz ovog razloga liječenje je proces usmjeren prema svakom pacijentu relativno individualno i kao takvo ovdje je izneseno u svojim najširim okvirima.

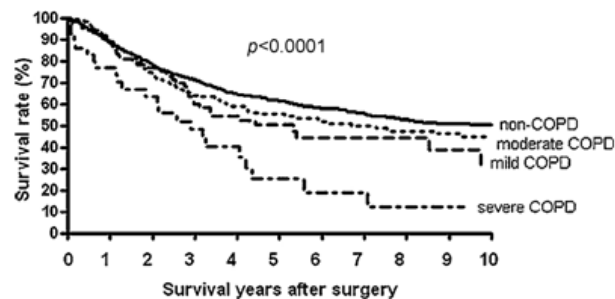
**Tablica 1. Prikaz prve linije terapije za pojedini stadij proširenosti bolesti te procijenjeno petogodišnje preživljenje (prilagođeno prema NCCN smjernicama iz 2017. godine) [8].**

| STADIJ | Standardna terapija u pacijenata bez aktivirajućih mutacija   | Preživljenje |
|--------|---|--------------|
| IA     | Kirurška resekcija  | 75%          |
| IB     |   | 55%          |
| IIA    | Kirurška resekcija  | 50%          |
| IIB    |   | 40%          |
| IIIA   | Kemo i radio terapija, kirurška resekcija u odabranih pacijenata  | 10-35%       |
| IIIB   | Kemo i radio terapija   | 5%           |
| IV     | Kemoterapija cisplatinom, kirurška resekcija solitarnih metastatskih lezija s resektabilnim primarnim tumorom | <5%          |

Prilikom izbora pacijenata za kiruršku resekciju potrebno je odrediti razinu očuvane plućne funkcije kako bi utvrdili može li pacijent podnijeti resekciju dijela pluća ili cijelog plućnog krila te limfnih čvorova. Dijagnostički postupci za procjenu funkcije respiracijskog sustava i mogućnosti resekcije pluća su: spirometrija (poglavito FEV1 parametar koji je pokazao i značajnu prognostičku vrijednost [18]), analiza plinova u arterijskoj krvi i acidobazni status,

određivanje difuzijskog kapaciteta pluća za CO, EKG, ultrazvuk srca te dodatne pretrage; scintigrafija pluća (ventilacijska i perfuzijska), testovi opterećenja (spiroergometrija), određivanje tlakova u plućnoj arteriji.[19]

Značajnim se pokazalo i postojanje KOPB-a kao komorbiditetnog stanja uz karcinom pluća. Naime statistički je značajno smanjeno preživljenje nakon kirurške terapije karcinoma pluća u pacijenata s KOPB-om (Slika 3).[18]



**Slika 3. Prikaz krivulja preživljenja nakon kirurške terapije karcinoma pluća u ovisnosti o postojanju i stupnju KOPB-a.[18]**

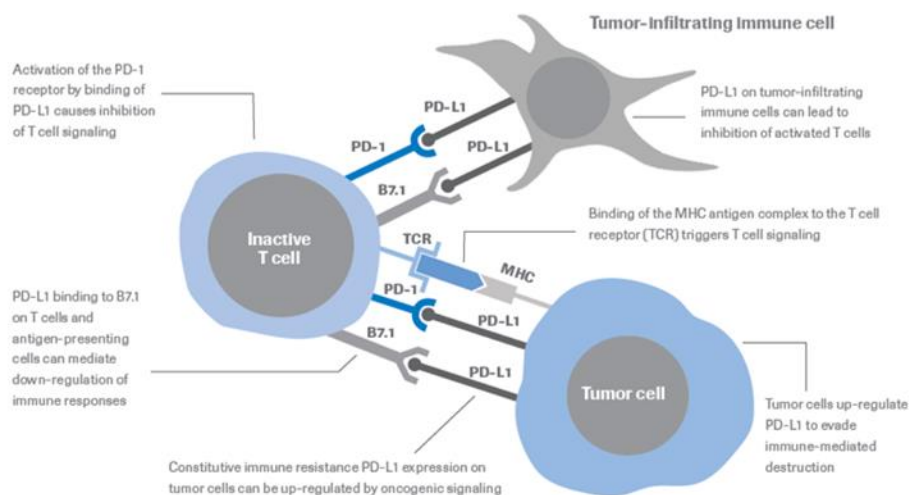
Kemoterapijski lijekovi koji se koriste bazirani su na platini, a dijele se u dvije grupe temeljene na cisplatini ili karboplatini. Ovisno o stadiju i općem stanju pacijenta biraju se pojedinačni lijekovi ili se primjenjuju kombinacije u ciklusima.

Nakon kirurške resekcije ili prilikom uzimanja biopsije rutinski se određuje status EGFR-a i ALK-a i to za neskvamozne i mješane karcinome uvijek dok za skvamozne samo kada se radi o nepušačima i/ili mladim bolesnicima.[19] Ukoliko su prisutne neke od ovih mutacija u prvoj liniji liječenja se primjenjuje ciljana terapija tirozin kinaznim inhibitorima za EGFR mutacije egzona 18-21 od kojih su u Republici Hrvatskoj na tržištu dostupni sistemski lijekovi erlotinib, gefitinib, afatinib (kao prva linija) te bevacizumab kao druga linija.[19] Kod prisutne translokacijske aktivirajuće mutacije ALK enzima lijek izbora je krizotinib u prvoj liniji te certinib i alektinib u drugoj liniji.[19]

## 1.2. PD-L1

### 1.2.1. Molekularna biologija i funkcija PD-L1 u tumorskom mikrookolišu

Ligand programirane stanične smrti 1 (eng. Programmed death ligand-1, u literaturi navođen i kao B7-H1, CD274) proteinska je molekula koja interferira s imunološkim sustavom. Ligand se veže za PD-1 (eng. Programmed death-1) i B7.1 receptor (Slika 4). B7 receptor, čija je podvrsta B7.1 receptor, potreban je kao koreceptor prilikom aktivacije limfocita T.[20] Naime, ukoliko inaktivni T limfocit bude podražen od strane antigena, prezentiranog putem MHC kompleksa, da bi došlo do diferencijacije u citotoksični odnosno aktivni T limfocit, potreban je istovremeni podražaj B7.1 receptora.[20] Ukoliko interakciju s B7.1 receptorom ostvari PD-L1, pokrenuti unutarstanični mehanizmi dovesti će do trajne inaktivacije te apoptoze limfocita.[20] Prema tome je PD-L1 i dobi ime kao ligand programirane stanične smrti (apoptoze). PD-1 receptor posjeduju T i B limfociti, monociti, NK stanice, dendritičke stanice, te tumor infiltrirajući limfociti.[3]



**Slika 4 Prikaz interakcija između tumorskih stanica i inaktivnih limfocita te tumor infiltrirajućih imunoloških stanica prilikom aktivacije PD-1/PD-L1 osi TCR- T-stanični receptor, B7.1- koreceptor za aktivaciju limfocita, MHC- kompleks histokompatibilnosti [21]**

PD-1 receptor zapravo je transmembranski protein kojeg kodira PDCD1 gen.[3] PD-1 ima dva liganda- PD-L1 i PD-L2, gdje je ligand -1 mnogo značajniji, jer je eksprimiran na brojnim stanicama dominantno imunološkog sustava ali i drugih tkiva (inaktivni T limfociti, B

limfociti, dendritičke stanice, makrofagi, endotelne stanice i stanice pankreasa), no i na brojnim tumorima, pogotovo NSCLC-u, melanomu, karcinomu bubrežnih stanica, hepatocelularnom karcinomu, različitim leukemijama i dr. [3] S druge strane PD-L2 ligand eksprimiran je na makrofagima i dendritičkim stanicama no s puno manjom učestalosti zbog čega nije puno istraživano.[3]

Fiziološka funkcija PD-1/PD-L1 imunološke interakcije je da modulira imunološki odgovor u smislu supresije kako ne bi došlo do oštećivanja vitalnog tkiva zahvaćenog upalom.[22]

Prema tome, PD-1/PD-L1 interakcija pokreće kompleksni unutarstanični signalni put koji inhibira proliferaciju, preživljenje, i efektorsku funkciju citotoksičnih T limfocita (CTL) u perifernim tkivima kao odgovor na upalu ili širenje tumora.[12] Također dugotrajna (kronična) upala s vremenom sve više potiče ekspresiju PD-L1 na CTL-ima što daje objašnjenje zašto se tumori češće pojavljuju u već kronično upaljenim tkivima.[23]

Istraživanja su pokazala da, kao odgovor na aktivaciju imunološkog sustava prilikom rasta i širenja tumora, tumorske stanice pretjerano ekspimiraju PD-L1, ali i PD-L2 kako bi mogle preživjeti u tijelu što dovodi do apoptoze tumor infiltrirajućih limfocita (TIL).[12,24] Ovakva pojačana ekspresija PD-L1 utječe na diferencijaciju regulatornih T limfocita održavajući njihovu imunološku neaktivnost.[12]

Neki proinflamatorni citokini također induciraju ekspresiju PD-L1 kako što su interferon gama (IFN- $\gamma$ ), faktor tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), lipopolisaharidi (LPS), faktori stimulacije granulocitnih i makrofagnih kolonija (GM-CSF), i vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF), od kojih su najjači stimulatori IL-10, IL-4 te IFN- $\gamma$ . [3] Nađeno je da tumor supresorski PTEN gen (eng. phosphatase and tension homolog deleted on chromosome ten) suprimira ekspresiju PD-L1.[3]

Ovakvi mnogostruki imunološki putevi kojima se funkcije isprepliću zapravo se zajednički uklapaju u koncept **tumorskog mikrookoliša**. Tumorski mikrookoliš sastoji se od različitih

stanica (imunološke, endotelne stanice, fibroblasti) i ne staničnih komponenti (različiti citokini) koji su značajni za progresiju tumora.[25,26] Kroz taj se koncept objašnjavaju složene interakcije između tumorskih i stanica domaćina u kojima je PD-1/PD-L1 put samo jedan od mnogih.

Tumorski mikrookoliš utječe na evoluciju tumora bilo u smislu širenja tumorskih stanica, izbjegavanja imunološkog sustava ili razvoja rezistencije na različite lijekove.[27] Najviše pažnje se pridaje tumor infiltrirajućim imunološkim stanicama.

Interakcija domaćina i tumorskih stanica opisuje se kroz tri faze - faza eliminacije, ravnoteže i faza bijega.[23] Faza eliminacije, prva je, dok je imunološki sustav senzibilan na neoplastične stanice te stvara specifične CTL-ove i NK stanice usmjerene na tumorske stanice. U toj fazi, budući da tumorske stanice još ekspimiraju MHC-I molekule, mogu biti prepoznate te uništene, što je fiziološki proces. Tada se tumor ne širi ili se čak i smanjuje. Tumorske stanice s vremenom mutiraju, stvarajući klonove koji su "nevidljivi" našem imunološkom sustavu. U tom trenutku nastupa faza ravnoteže kada se tumor i dalje ne širi, ali se aktivno prilagođava uvjetima mikrookoliša. S vremenom se stvaraju klonovi tumorskih stanica koji će producirati različite citokine i poticati mehanizme izbjegavanja imunološkog sustava te će tumor onda dalje progredirati i počinje faza ekspanzije.[23]

Mehanizmi kojima tumor izbjegava imunološki sustav su slijedeći: 1- inhibicija prezentacije antigena tumora preko inhibicije ekspresije MHC-1 molekula; 2-sekrecija immunosupresivnih citokina (TGF- $\beta$ , indolamin 2,3-dioxigenaza (IDO), IL-10); 3-inhibicija imunoloških puteva kroz disrupciju inhibitornih T limfocitnih kontrolnih točaka i aktivirajućih puteva, otpuštanjem Fas-liganda i drugih liganda stanične smrti (kao što je i PD-L1); 4-Lučenje različitih kemotaktičnih molekula koje potiču infiltraciju s immunosupresivnim stanicama kao što su regulatorni T limfociti, M2 makrofazi i sl.[23]

Ovi procesi se događaju simultano i s vremenom oslabljuju sposobnost imunološkog sustava da uništi tumorske stanice i omogućuje daljnje lokalno i udaljeno širenje tumora. Kada ovako promatramo tumorsko tkivo primjećujemo da je ono metabolički i imunološki izrazito aktivno i promjenjivo s velikom sposobnosti prilagodbe na okolne podražaje. Ovakav pogled na tumorsko tkivo objašnjava zašto je potrebna stalna reevaluacija stadija prilikom liječenja, zašto tumorsko tkivo s vremenom slabije reagira na antitumorske lijekove i zašto vrlo često kada dođe do relapsa bolesti, odnosno daljnjeg širenja, obično tumor bude maligniji i otporniji na terapiju.

U konačnici zašto je u onkološkom pristupu pacijentima s NSCLC, ali i drugim tumorima, maksimalno individualizirani pristup zaista nešto čemu treba težiti.

### **1.2.2. Ekspresija PD-L1 u tumorskom tkivu i klinički značaj**

PD-L1 eksprimira se heterogeno unutar tumorskog tkiva.[22] Ova činjenica znatno otežava procjenu obojenosti tumorskih stanica ukoliko se radi o malim uzorcima (transtorakalne ili bronhoskopske biopsije). Mnogi istraživači poentirali su ovu problematiku te ističu kako je, ukoliko se radi o malim biopsijama, potrebno uzeti biopsije sa više mjesta ili nakon kirurške resekcije tumora, ukoliko takve bude, te ponovno evaluirati PD-L1 ekspresiju.[28]

Povećana ekspresija PD-L1 povezana je s lošijom prognozom i većom invazivnošću NSSKP-a, ali je ista korelacija pokazana i u drugim tumorima kao što su hepatocelularni i kolorektalni karcinom.[29,30] Također se pokazalo da je u pacijenata s mutiranim EGFR receptorom veća ekspresija PD-L1 nego u onih s divljim tipom EGFR-a. [31] Neke studije provedene na istočnim Azijatima, gdje je ova mutacija najučestalija, nisu pokazale značajnost učestalosti EGFR mutacija i pojačane ekspresije PD-L1 što nam govori da je potrebno još proširiti znanje u ovom području.[32]

Prema istraživanjima u tumorima koji imaju EGFR i KRAS mutacije PD-L1 je značajno više eksprimiran.[33]

U pacijenata s moždanim metastazama primarnog NSSKP-a ciljana imunoterapija blokatora PD-1/PD-L1 imunološkog puta pokazala se izrazito uspješnom u redukciji metastatskog tumorskog tkiva.[34] Broj CD8+ TIL-a kao i ekspresija PD-L1-a značajno je manja u tumorskom tkivu moždanih metastaza nego primarnom plućnom tumorskom tkivu.[34] Ova dinamika ovisi o vremenu pojave metastaza u odnosu na primarni tumor.[34]

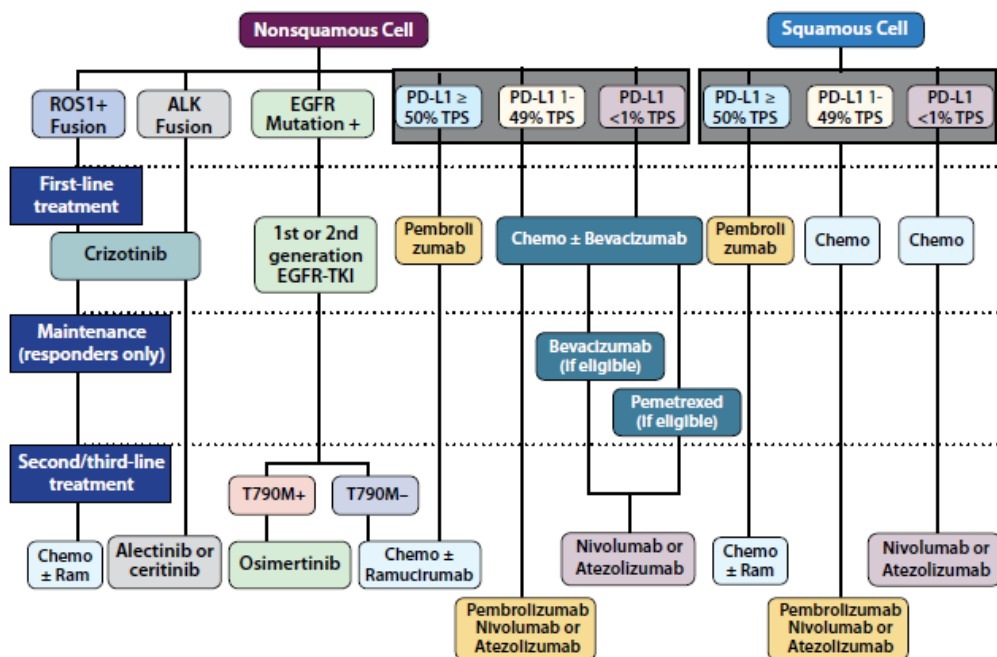
Ta činjenica govori o prostornoj i vremenskoj heterogenosti ekspresije PD-L1 što je isto nešto što treba uzeti u obzir prilikom evaluacije. Teoretski iz toga proizlazi, da ukoliko pacijent prilikom inicijalne patohistološke obrade i evaluacije ekspresije PD-L1 nije kandidat za terapiju tim inhibitorima, ima smisla ponovno evaluirati PD-L1 ekspresiju nakon nekog vremena, kojeg treba utvrditi dodatnim istraživanjima.

### **1.2.3. Ciljana terapija NSSKP-a i individualizirani pristup liječenju**

Tumor pluća, i to ne-sitnostanični tip, kao jedan od najučestalijih karcinoma u populaciji često je izrazito malignog toka. Kako je prikazano u Tablici 1, preživljenje za pacijente s NSSKP-om, koje naravno ovisi o stadiju bolesti, relativno je kratko. Otežavajuća okolnost je što se u većine pacijenata bolest otkrije u uznapredovalom stadiju kada nije moguće kirurški resecirati cijeli tumor. Tada je preživljenje vrlo kratko čak i unatoč standardnoj terapiji. Prema tome u posljednje vrijeme sve se više istraživanja usmjerava prema istraživanju tumorskog mikrookoliša i analiziranja genoma tumorskih stanica u svrhu razvijanja lijekova koji bi bili efikasniji u liječenju ili barem u zaustavljanju progresije tumora i aktivacije fizioloških mehanizama imunološkog sustava i stanica, kako bi mogle ograničiti i eliminirati tumor.(Dodatak 4)



Lijekovi koji se trenutno koriste ili su u kasnim fazama kliničkih istraživanja od blokatora PD-1/PD-L1 imunološke osi dijele se u blokatore PD-1 receptora i PD-L1 liganda. Blokatori PD-1 receptora su Nivolumab i Pembrolizumab, a blokatori liganda su Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab.[28] Svi nabrojani lijekovi su humanizirana monoklonalna IgG protutijela, te su izrazito sigurni za primjenu u liječenju prema dosadašnjim istraživanjima.[28] Jedino je pri primjeni Avelumaba u predkliničkim istraživanjima primijećena protutijelima i kompleksom posredovana citotoksična reakcija.[28]



**Slika 5. Shema algoritma liječenja NSSKP predložena od strane IASLC u siječnju 2017. TPS- postotak obojenosti tumorskih stanica (eng. tumor proportion score), TKI- tirozin-kinazni inhibitori, Chemo-kemoterapija, Ram- Ramucirumab [28]**

Na Slici 5 prikazana je *cut-off* vrijednost procijene postotka obojenosti tumorskih stanica u tumorskom tkivu, no ona je ovisna o vrsti protutijela koji se koriste te je svakom lijeku pridružen točno određeni klon protutijela koji se koristio za detekciju PD-L1 u tumorskim stanicama (Tablica 2).

**Tablica 2. Prikaz lijekova koji se propisuju u ovisnosti o klonu protutijela korištenom prilikom detekcije ekspresije PD-L1 [S]**

| Lijek         | Klon protutijela (proizvođač) |
|---------------|-------------------------------|
| Nivolumab     | 28-8 (Dako)                   |
| Pembrolizumab | 22C3 (Dako)                   |
| Atezolizumab  | SP142 (Ventana)               |
| Durvalumab    | SP263 (Ventana)               |
| Avelumab      | 73-10 (Dako)                  |

Mnogo se lijekova nalazi u fazi kliničkih istraživanja (Dodatak 3), ali tek su neki odobreni za primjenu u liječenju. Američka Agencija za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration, FDA), a to su do sada Nivolumab, Pembrolizumab i Atezolizumab.[28] Durvalumab i Avelumab kao PD-L1 inhibitori u naprednoj su fazi kliničkih istraživanja i pokazuju dobre rezultate.[28]

Budući da se PD-L1 jače eksprimira u tumora s mutiranim EGFR-om postavljena je teorijska osnova za istraživanja u smislu kombinirane ciljane terapije usmjerene na PD-L1 i EGFR.

Prema nekim kliničkim istraživanjima pacijenti s PD-L1 negativnim NSSKP-om također su dobro reagirali na anti PD-L1 terapiju.[35] S druge strane neki pacijenti koji su po kriterijima izbora terapije imali PD-L1 pozitivne tumore nisu reagirali na terapiju PD-1/PD-L1 inhibitorima.[3] Kao objašnjenje istraživači nude manjkavosti u smislu evaluacije ekspresije PD-L1 imunohistokemijskih bojenja zbog različitih protutijela koja se koriste za bojenje, zbog subjektivne procjene obojenosti odnosno nestandardiziranih metoda evaluacije bojenja. [36] Ciljana terapija inhibitorima PD-1/PD-L1 puta tek je u svojim začetcima te je potrebno još puno istraživanja u području kombinirane ciljane i radio i kemo terapije da se razrade detaljni protokoli i istraže interakcije odnosno postave standardizirane sheme kombinirane terapije koje bi produžile preživljavanje, ali i kvalitetu života pacijenata oboljelih od NSSKP.

KOPB kao čest komorbiditet u pacijenata s NSSKP-om treba uzeti u obzir prilikom izbora pacijenata za ciljanu anti PD-1/PD-L1 terapiju. Stroll i sur. istraživali su djelovanje ovih inhibitora na progresiju KOPB-a u pacijenata s NSSKP koji su liječeni ovom terapijom i pokazali kako ona ubrzava napredak KOPB-a.[37] Mc Kendry i sur., pokazali su da je ekspresija PD-L1-a smanjena na makrofagima u pacijenata s KOPB-om. [38] Objašnjenje da je za pacijente viša ekspresija PD-L1 povoljnija, kako bi se upala pa i oštećivanje tkiva pluća smanjilo, implicira da korištenje inhibitora ove imunološke osi mora biti pažljivo izbalansirano prema mogućem pogoršanju upale i napretku KOPB-a. Sami istraživači naglašavaju kako su hitno potrebna dodatna istraživanja kako bi se odredila sigurnost primjene ovakve terapije u pacijenta s KOPB-om.

Brojna istraživanja uspoređivala su ekspresiju PD-L1 u NSSKP-u i duljinu preživljenja pacijenata, a rezultati se razlikuju između bijelaca i istočnih Azijata (Dodatak 2), gdje potonji imaju lošiju prognozu.[22] Ovakvi, različiti, pa i kontradiktorni podatci impliciraju činjenicu da postoji još neotkrivenih faktora i mehanizama koji utječu na preživljenje.

Sekvenciranje nove generacije (engl. next generation sequencing, NGS) sve je prisutnije u rutinskoj dijagnostici različitih stanja što zbog sve šire dostupnosti što zbog smanjenog troška testiranja. „GeneReader“ platforma, koja se trenutno razvija u Njemačkoj, iz uzorka tkiva NSSKP-a testira sve mutacije koje su se pokazale relevantnima za predviđanje odgovora na terapiju.[39] S druge strane razvijena je baza podataka u sklopu Geno2pheno projekta koja ima za cilj sa sakupljenim podacima i razvijenim softverskim algoritmima predviđati rezistenciju virusa na antivirusne lijekove. Cilj je stalnim povećavanjem baze podataka proširivati izvore iz kojih bi algoritam različitim analizama podataka rezistencije mogao sam predviđati vjerojatnost rezistencije za tražene uzorke, ovako bi procijenjena rezistencija s vremenom postajala sve točnija.[39]

Ovaj koncept je upravo ono čemu se teži s prikupljenim podacima „GeneReader“ platforme,

kako bi mogli predvidjeti odgovor pacijenata na ciljanu terapiju. Kako je razrađeno u ovom i prethodnom poglavlju vidi se da zaista mnogo faktora utječe na ishod liječenja od etničkog porijekla pacijenata, različitih mutacija gena u tumorskim stanicama, različitih genskih polimorfizama i sl. Ovakvim pristupom, gdje bi se preko NGS-a mogao detaljno zabilježiti genom tumorskih stanica i u kombinaciji s kliničko-patološkim i demografskim podacima, sigurno bi se detaljnije utvrdili faktori bitni za odgovor na terapiju. Budući bi podatke obrađivala baza sama te iz istih učila, predviđanja bi s vremenom bila još preciznija, što bi u konačnici bilo maksimalno efikasno za pacijente, a minimalno financijski opterećujuće za zdravstveni sustav.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ekspresija liganda PD-L1 danas je aktualna tema te je u ovom istraživanju opći cilj utvrditi ekspresiju PD-L1 posebno u tumorskim stanicama (TS) i posebno u stanicama tumorskog intersticija (IS) te istražiti povezanost iste s kliničko-patološkim karakteristikama tumora.

1. Odrediti ekspresiju PD-L1 u TS i IS uzimajući u obzir intenzitet i postotak obojenih stanica s ciljem određivanja H-skora u tumorskim (TS H-skor) i intersticijskim stanicama (IS H-skor).
2. Usporediti TS H-skor sa IS H-skorom.
3. Utvrditi razliku u ekspresiji TS i IS H-skora između različitih histoloških podtipova NSSKP.
4. Utvrditi međusobnu povezanost ekspresije PD-L1 u TS i IS NSSKP-a s prognostičkim čimbenicima kao što su stupanj diferenciranosti tumora (gradus), veličina tumora, proliferacijski indeks tumora, invazija pleure te stadij proširenosti bolesti.
5. Ispitati utjecaj ekspresije PD-L1 u TS i IS na dužinu preživljenja bolesnika od datuma postavljanja dijagnoze.

### **3. ISPITANICI, MATERIJALI I POSTUPCI**

#### **3.1. Ispitanici i materijali**

Istraživanje je provedeno na arhivskom bioptičkom materijalu pacijenata s NSSKP-a koji su operirani na Klinici za torakalnu kirurgiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Rijeka od 2001. Do 2011. godine zbog tumora pluća te čije je tkivo standardnim postupkom fiksirano i uklopljeno u parafin na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. U istraživanje su uključeni svi pacijenti redom kod kojih su postojali svi potrebni patohistološki i klinički podatci te dovoljna količina očuvanog tumorskog tkiva.

Patohistološki podaci su očitani iz računalne baze podataka Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, a klinički podaci su prikupljeni iz medicinske dokumentacije bolesnika sa NSSKP-om iz računalne baze podataka KBC Rijeka. Podaci o dužini preživljenja bolesnika sa NSSKP-om su prikupljeni iz dokumentacije Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.

Cjelokupni materijal koji se odnosi na pojedinu biopsiju je pregledan i reklasificiran prema novoj klasifikaciji tumora pluća Svjetske zdravstvene organizacije iz 2015. godine.[40]

U istraživanje je uključeno 110 uzoraka NSSKP-a za potrebe izrade tkivnih mikroregija (TMA, od engl. tissue microarray). Na osnovi arhivskih mikroskopskih stakala odabrane su odgovarajuće parafinske kocke, te je na mikroskopskom staklu označen dio od interesa. Na temelju označenog stakla, odredila se regija od interesa na tzv. donorskoj parafinskoj kocki. Upotrebom ručnog uređaja za izradu tkivnih mikroregija (Alphelys, Plaisir, France) stvorene su tkivne mikroregije u kojima je svaka biopsija zastupljena s četiri cilindra tumorskog tkiva promjera 2 mm. Iz svakog uzorka tumora odabrana su dva cilindra koja predstavlja centralnu tumorsku regiju i dva cilindra iz područja invazivne fronte tumora.

## **3.2. Postupci**

### **3.2.1. Određivanje prognostičkih faktora**

U istraživanju su analizirani prognostički faktori koji se određuju prilikom procesa dijagnostike NSSKP-a, a to su histološki podtip, TNM stadij, patološki stadij (pT), stupanj diferencijacije tumora (gradus), invazija pleure i prisutstvo sekundarnog depozita u regionalnim limfnim čvorovima. Iz odgovarajuće dokumentacije dobiveni su podaci o postojanju udaljenih metastaza u trenutku postavljanja dijagnoze, kao i dužina preživljenja bolesnika tijekom petogodišnjeg razdoblja.

### **3.2.2. Imunohistokemijsko bojanje**

Parafinski rezovi debljine 3-4 µm su sušeni preko noći na temperaturi od 55°C, deparafinizirani i dehidrirani na uobičajeni način.

Anti-PD-L1 protutijelo: postupci razotkrivanja antigena, inkubacija s primarnim protutijelom, vizualizacijskim sustavom te kromogenom kao i kontrastiranje s hematoksilinom učinjeni su korištenjem VENTANA PD-L1 (SP263) eseja (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) u automatiziranom imunobojaču Ventana Benchmark XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) prema uputama proizvođača.

Anti-Ki-67 protutijelo: za razotkrivanje antigenskih epitopa korišten je toplinom inducirani pretretman. Rezovi su uronjeni u Tris-EDTA pufer, pH 9 (10 mM Tris baze, 1 mM EDTA otopine) i zatim u vodenu kupelj tijekom 10 minuta na temperaturi od 95-100 °C. Nakon 45 minuta hlađenja na sobnoj temperaturi rezovi su inkubirani s otopinom za blokiranje nespecifičnog vezivanja protutijela koja sadrži normalni serum koze (DakoCytomation, Glostrup, Danska) tijekom 30 minuta. Nadalje je korištena LSAB imunohistokemijska metoda u automatskom imunobojaču (DakoCytomation Colorado Inc, Fort Collins, CO, SAD) prema uputama proizvođača, a primarno protutijelo koje je korišteno tijekom 30 min. inkubacije je

bilo mišje monoklonalno IgG1 protutijelo (klon MIB1, 1:50, DakoCytomation, Glostrup, Danska). Za vizualizaciju specifičnosti vezivanja primarnog protutijela korišten je ChemMate™ detection kit (K 5001 i K 5007, DakoCytomation, Glostrup, Danska). Kao negativna kontrola služio je rez na kojem se umjesto sekundarnog protutijela nalazio razrjeđivač protutijela ChemMate antibody diluent (S 2022, DakoCytomation, Glostrup, Danska).

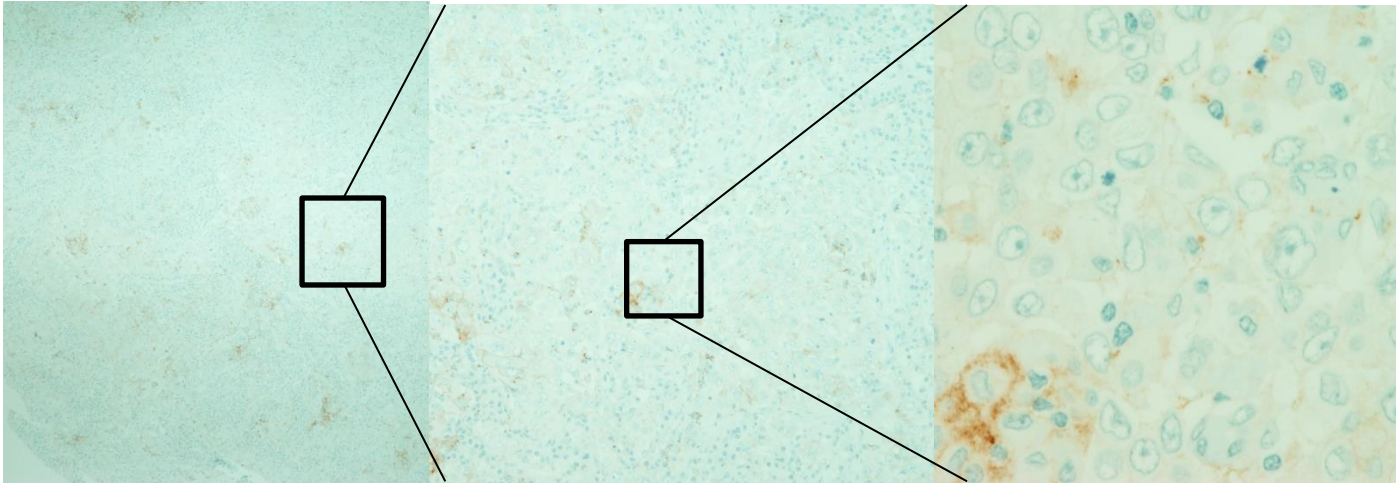
### **3.2.3. Određivanje proliferativne aktivnosti tumorskih stanica**

Proliferativna aktivnost tumorskih stanica određena je brojanjem 1000 jezgri tumorskih stanica pod svjetlosnim mikroskopom, te je izražena kao indeks proliferacije koji označava postotak pozitivno obojanih tumorskih jezgri s protutijelom protiv Ki-67 koji prikazuje tumorske stanice u proliferaciji.

### **3.2.4. Određivanje ekspresije PD-L1 proteina**

Postotak i jačina obojanosti tumorskih stanica određeni su pod svjetlosnim mikroskopom, a rezultat je izražen kao histološki skor (H-score, od engl. *histological score*) koji predstavlja zbroj umnožaka postotka i pripadajućeg intenziteta reakcije.[41] Postotak imunohistokemijski obojanih tumorskih stanica određen je približno, dok je jačina obojanosti tumorskih stanica određena kao: 0 (nema obojanosti), 1 (slaba obojanost, vidljiva na 40x uvećanju), 2 (umjerena obojanost, vidljiva na 4x, no postotak tako obojenih stanica jasno se može interpretirati na 10x povećanju) i 3 (jaka obojanost, jasno vidljiva na 4x povećanju) (Slika 5).





### **Slika 5. Prikaz PD-L1 intenziteta 1 i 2**

A-povećanje 4x, slabije je vidljivo obojenje 2 na nekim dijelovima preparata. B-povećanje 10x, jasno je vidljivo obojenje intenziteta 2, dok se na ostatak stanica nazire obojenje no teško je razlučiti jesu li ili nisu pozitivne, C-povećanje 40x, sve stanice u vidnom polju su pozitivno obojane intenzitetom 1 pretežito membranske komponente osim stanice u lijevom donjem kutu koja se vidi i na slici B koja pokazuje membransko i citoplazmatsko obojenje intenzitetom 2.

### **3.2.5. Statistička obrada podataka**

Prikupljeni podaci uneseni su u proračunsku tablicu i obrađeni pomoću računalnog programa Statistica 9 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD) uz razinu statističke značajnosti od  $p < 0.05$ . U radu su korištene osnovne metode deskriptivne statistike pri čemu su izračunati standardni pokazatelji centralne tendencije i rasapa. Analiza normalnosti raspodjele uzorka učinjena je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. Testiranje značajnosti razlike srednje vrijednosti učinjeno je parametrijskim (Studentov t-test, ANOVA) i neparametrijskim testom (Mann-Whitney U-test, Kruskal-Wallis test), ovisno o rezultatu testiranja normalnosti raspodjele. U analizi korelacije kontinuiranih podataka korišten je Pearsonov korelacijski test. Postotak kumulativnog preživljavanja bolesnika za petogodišnje razdoblje određen je Kaplan-Meier-ovom metodom, a razlika između krivulja preživljavanja utvrđena je pomoću log-rank testa.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Kliničkopatološki podaci

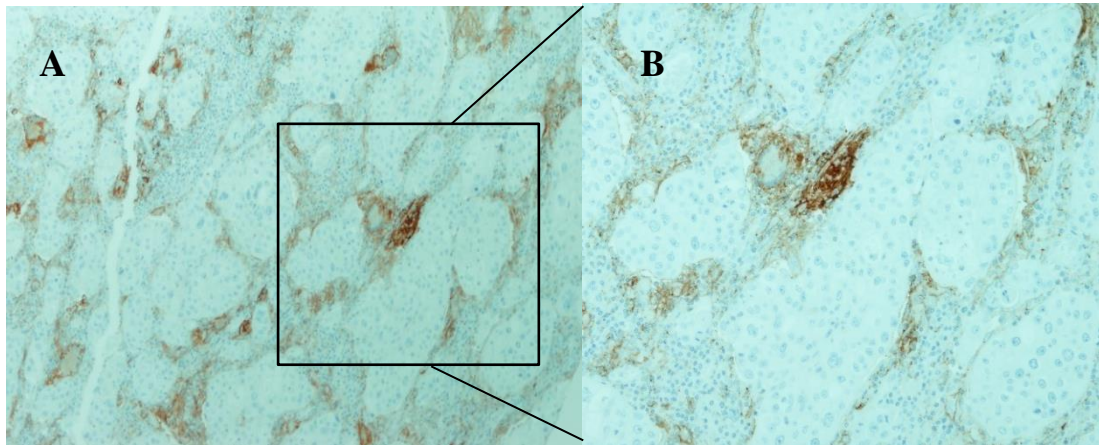
Kliničkopatološka obilježja 110 bolesnika s karcinomom ne-malih stanica pluća u ispitivanom uzorku prikazuje Tablica 3. Ispitanike su većinom činili muškarci (72%) starije životne dobi, median dobi iznosio je 63 godine s rasponom od 42 do 85 godina. Planocelularni i adenokarcinomi gotovo su jednako zastupljeni, dok su ostali patohistološki tipovi NSSKP-a činili svega 9% uzorka. Najzastupljeniji je patološki gradus 2 (49.1%), i patološki stadij 2 (59%) s dominantnim udjelom stadija 2a (44.5%). Budući da se radi o operiranim bolesnicima više od polovine uzorka činili su tumori niskog kliničkog stadija (89.9% stadiji IA, IB i IIA).

**Tablica 3. Kliničkopatološka obilježja bolesnika s ne-sitnostaničnim karcinomom pluća**

| Obilježje  |            |
|--|------------|
| Dob bolesnika (god.), medijan (raspon)   | 63 (42-85) |
| Spol bolesnika (M/Ž) (br.)   | 80/30      |
| Patohistološki tip tumora (adenokarcinom/planocelularni karcinom/ostali) (br.) | 49/51/10   |
| Veličina tumora (cm), medijan (raspon)   | 4 (0.6-10) |
| Gradus tumora, br. (%)   |            |
| 1  | 14 (12.7)  |
| 2  | 54 (49.1)  |
| 3  | 42 (38.2)  |
| Patološki stadij, br. (%)  |            |
| 1a   | 17 (15.5)  |
| 1b   | 22 (20)    |
| 2a   | 49 (44.5)  |
| 2b   | 16 (14.5)  |
| 3  | 6 (5.5)    |
| Stadij bolesti, br. (%)  |            |
| IA   | 25 (22.7)  |
| IB   | 37 (33.6)  |
| IIA  | 37 (33.6)  |
| IIB  | 9 (8.2)    |
| IIIA   | 2 (1.9)    |

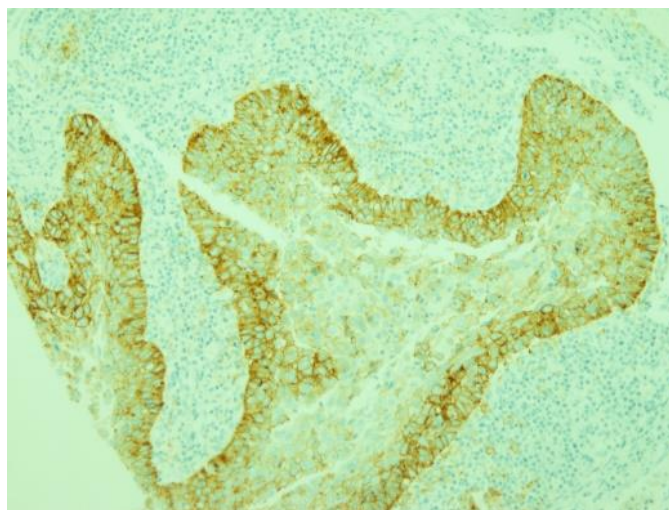
#### 4.2. Imunohistokemijsko PD-L1 bojanje

Ekspresija PD-L1 liganda je uočena u tumorskim stanicama kao i u različitim intersticijskim stanicama kao membransko i citoplazmatsko bojenje različitog intenziteta. Primijećeno je da je obojenje tumorskih i stanica intersticija bilo dominantno izraženo na tumorskim stanicama dok je bilo vrlo slabo na stanicama intersticija i obrnuto (Slika 6).



**Slika 6. Prikaz različite PD-L1 ekspresije u tumorskom tkivu**  
Tumorske stanice su PD-L1 negativne, dok je intersticij snažno pozitivan  
(IH, A-povećanje 4x, B-povećanje 10x).

Osim toga, u nekih uzoraka, primijećen je veći intenzitet obojenja tumorskih stanica koje su bliže intersticiju tumora (Slika 7).



**Slika 7. Prikaz PD-L1 heterogene ekspresije u tumorskim stanicama.**  
Veći intenzitet PD-L1 obojenja tumorskih stanica prisutan je na granici nakupine tumorskih stanica i intersticija.

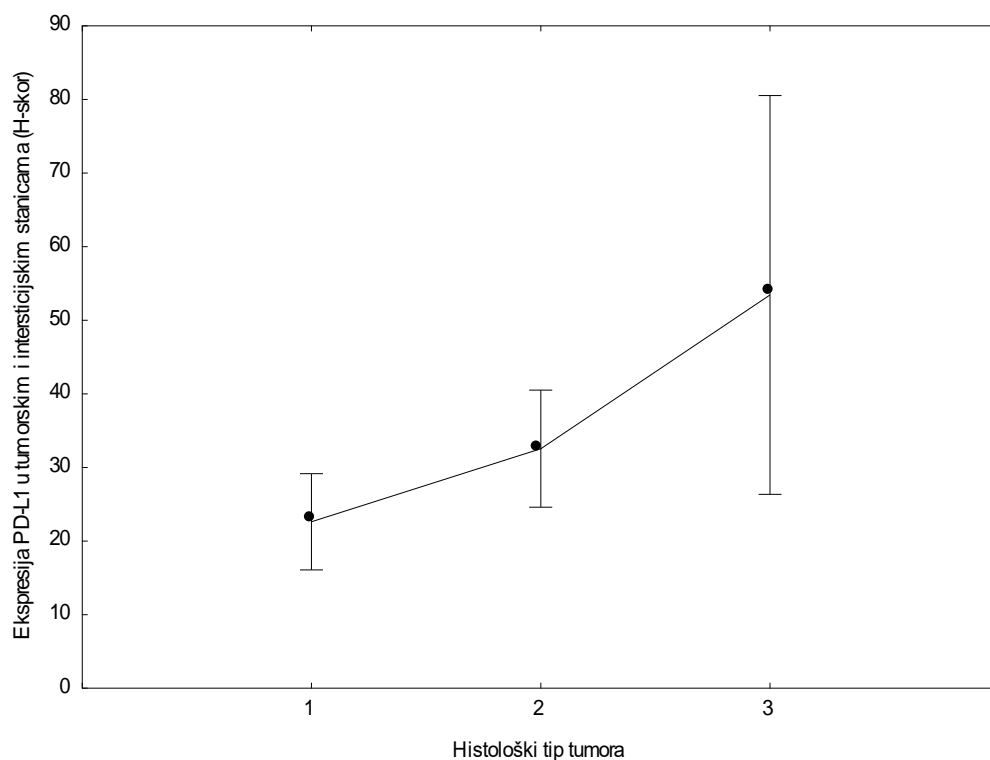
Medijan H-skora u tumorskim stanicama je bio 8.12 (raspon 0-199.15), a medijan H-skora u intersticijskim stanicama je bio 14.04 (raspon 0-60) pri čemu nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji između područja centra i invazivne fronte tumora (Tablica 4).

**Tablica 4. Prikaz PD-L1 H-skora u različitim strukturama tumorskog tkiva.**

| Strukture tumorskog tkiva                                 |                                  | Medijan | Raspon   |
|---|----------------------------------|---------|----------|
| Tumorske stanice  | Centar tumora                    | 6.75    | 0-300    |
|   | Invazivna fronta                 | 9.50    | 0-145    |
|   | Ukupno centar i invazivna fronta | 8.12    | 0-199.15 |
| Intersticijske stanice                                    | Centar tumora                    | 12.25   | 0-71.67  |
|   | Invazivna fronta                 | 15      | 0-58.33  |
|   | Ukupno                           | 14.04   | 0-60     |
| Ukupna ekspresija u tumorskim i intersticijskim stanicama |                                  | 29.31   | 0-209.68 |

S druge strane PD-L1 ekspresija u TS i IS pokazala je statistički značajnu korelaciju ( $p=0.002$ ,  $r_p=0.286$ ).

Ekspresija PD-L1 u tumorskim stanicama pokazuje trend u razlici između histoloških tipova NSSKP-a ( $p=0.068$ ), a kada joj se pridoda ekspresija na IS, dolazi do pojave statistički značajne razlike ( $p=0.003$ ).



**Slika 8. Prikaz povećanja ekspresija PD-L1 u tumorskom tkivu u odnosu na histološki tip (1-planocelularni karcinom, 2-adenokarcinom, 3-ostali, većinom velikostanični karcinom) (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0.003$ ).**

#### 4.3. Povezanost PD-L1 ekspresije s kliničkopatološkim parametrima i preživljenjem bolesnika

Kliničkopatološke parametre u odnosu na PD-L1 ekspresiju prikazuje Tablica 5.

**Tablica 5. Povezanost prognostičkih čimbenika ne-sitnostaničnog karcinoma pluća s PD-L1 ekspresijom. Prikazane su samo p vrijednosti.**

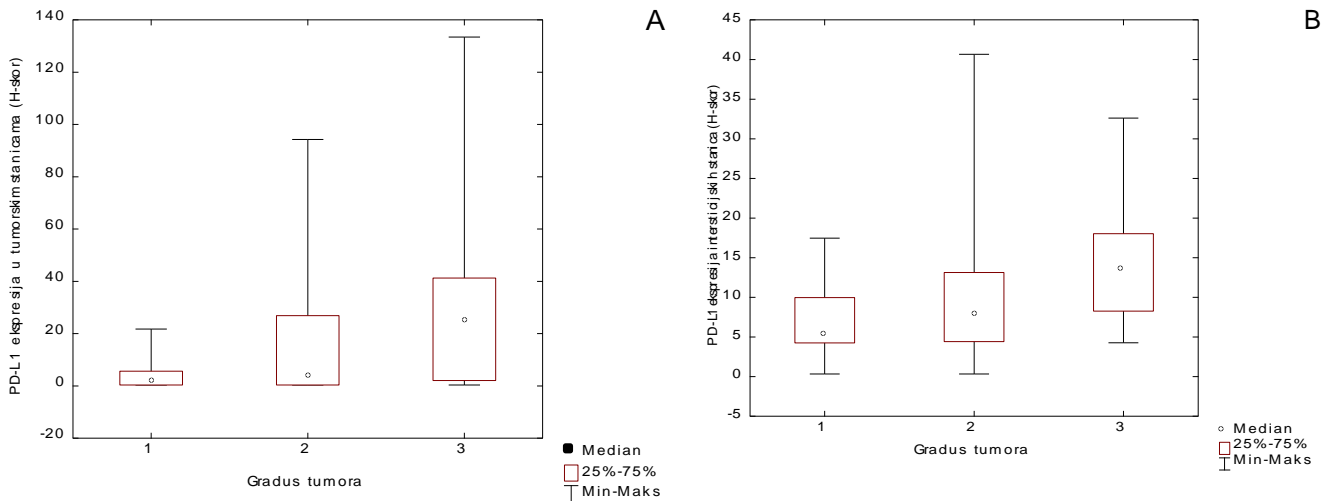
|                  | Veličina tumora    | Gradus tumora       | Ki-67 indeks       | Patološki stadij   | Klinički stadij    |
|------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| PD-L1 TC H-score | 0.627 <sup>1</sup> | 0.002 <sup>2</sup>  | 0.022 <sup>1</sup> | 0.011 <sup>2</sup> | 0.046 <sup>2</sup> |
| PD-L1 IC H-score | 0.466 <sup>1</sup> | <0.001 <sup>2</sup> | 0.217 <sup>1</sup> | 0.017 <sup>2</sup> | 0.027 <sup>2</sup> |

<sup>1</sup>Pearsonova korelacija

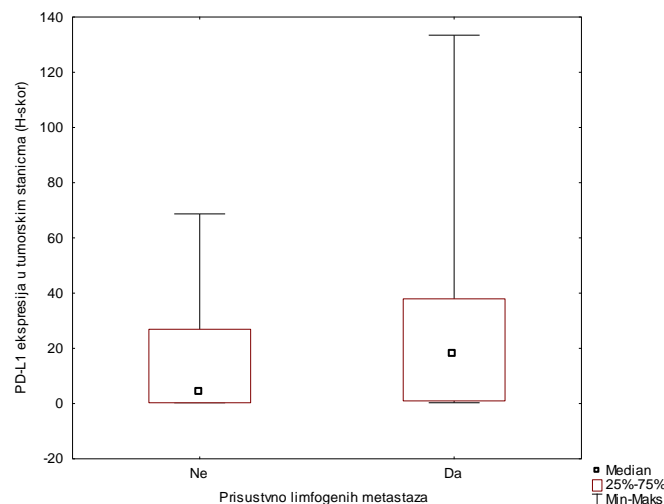
<sup>2</sup>Kruskal-Wallis ANOVA

Statistička analiza je pokazala povezanost između PD-L1 ekspresije i gradusa tumora (Slika 9), patološkog te kliničkog stadija bolesti – u prvom redu limfogenih metastaza

(Slika 10) i to kako za TS tako i u slučaju IS. Statistička analiza nije pokazala povezanost između PD-L1 ekspresije i veličine tumora te dužine preživljenja bolesnika s ne-sitnostaničnim karcinomom pluća.

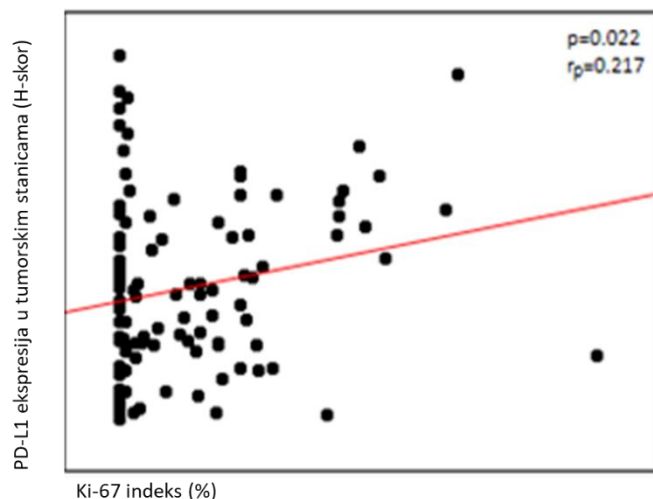


**Slika 9. Kruskal-Wallis ANOVA test prikazuje povezanost višeg gradusa tumora s većom ekspresijom PD-L1 liganda u TS (A) ( $p=0.002$ ) i IS (B) ( $p<0.001$ )**



**Slika 10. Mann-Whitney U-test pokazuje povezanost između veće PD-L1 ekspresije u TC i limfogenih metastaza ne-sitnostaničnog karcinoma pluća ( $p=0.048$ )**

Također, dobivena je značajna povezanost proliferativne aktivnosti tumorskih stanica izražene kroz Ki-67 indeks i PD-L1 ekspresije na razini tumorskih stanica ( $p=0.022$ ,  $r_p=0.217$ ) (Slika 11).



**Slika 11. Dijagram pokazuje pozitivnu korelaciju Ki-67 indeksa proliferacije tumorskih stanica i PD-L1 ekspresije u ne-sitnostaničnom karcinomu pluća.**

Zahvaćanje pleure kao loš klinički i prognostički pokazatelj nije bio statistički značajno povezan s PD-L1 ekspresijom u TS, ali je povezanost dokazana za PD-L1 ekspresiju u IS ( $p=0.026$ ) (Slika 12.).



**Slika 12. Mann-Whitney U-test pokazuje povezanost između veće PD-L1 ekspresije u IS i zahvaćanja pleure ne-sitnostaničnog karcinomom pluća.**

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju pokazana je statistički značajna korelacija ekspresije PD-L1 molekule u tumorskim i intersticijskim stanicama s histološkim gradusom i patološkim stadijem bolesti.

Uočeno je da je u uzorcima tkiva klinički uznapredovalih karcinoma pluća ne-malih stanica značajno povećana ekspresija PD-L1 i u tumorskim i u intersticijskim stanicama naspram tumora nižeg stadija i gradusa. Istu povezanost s histološkim gradusom NSSKP-a te bez povezanosti s preživljenjem našli su i Brandon i sur.[42] U tom istraživanju, provedenom na uzorku od 163 ispitanika sličnih obilježja kao i naš uzorak, s istim medijanom godina i visokim postotkom tumora niskog gradusa dok intenzitet nije uzet u obzir.[42]

Analizom proliferativnog indeksa tumorskih stanica invazivne fronte (ekspresija Ki-67) dobivena je pozitivna korelacija s ekspresijom PD-L1 u tumorskim stanicama invazivne fronte, i ukupnom ekspresijom ovog proteina u svim sastavnicama tumorskog tkiva.

Korelaciju ekspresije Ki-67 s ekspresijom PD-L1 u tumorskim stanicama pokazali su Takada i sur. [43] u svom istraživanju, gdje je ova korelacija nađena u grupi pacijenata u kojih je *cut-off* vrijednost za pozitivitet tkiva bila 1%, dok intenzitet nije uzet u obzir. Sterlacci i sur. [44] pokazali su također pozitivnu korelaciju ekspresije PD-L1 s Ki-67 mitotskim indeksom (procjenjivao se postotak PD-L1 pozitivnih tumorskih stanica s membranskim i/ili citoplazmatskim obojenjem klonom Ventana SP142).

Ovakva korelacija osnažuje, već od prije poznatu činjenicu, da inhibicijom imunološkog sustava tumorske stanice se pojačano dijele. Promatran je proliferativni indeks invazivne fronte tumora pa možemo povezati i zašto je ekspresija PD-L1 proporcionalna i s većim patološkim gradusom i kliničkim stadijem.

Kontroverzni su rezultati različitih istraživanja koja su povezivala ekspresiju PD-L1 s preživljenjem u cilju korištenja ekspresije PD-L1 kao biomarkera preživljenja pacijenata s



NSSKP-om. U Dodatku 2 pokazana je tablica s različitim rezultatima istraživanja koja su istraživala ovu povezanost.

Jedne od većih studija provedenih na ovu temu povezala su povećanu ekspresiju PD-L1 u NSSKP s boljom prognozom. [45,46] Velcheti i sur. Koristili su protutijelo koje nije komercijalizirano (5H1) te je istraživanje teško ponoviti da bi se utvrdila konzistentnost rezultata.[45] Nadalje, u drugim epitelnim tumorima kao što su: hepatocelularni karcinom [47], karcinom bubrega [48], ovarija [49], dojke [50], urotela [51] i rektuma [52] ekspresija PD-L1 povezana je s lošom prognozom što odgovara našim rezultatima.

S druge strane veliko meta istraživanje objavljeno u travnju 2015. godine koje je okupilo šest studija i ukupno 1157 pacijenata prikazalo je rezultate korelacije povećane ekspresije PD-L1 i slabije diferencijacije tumora ( $p=0.001$ ), te lošije prognoze u vidu kraćeg preživljenja u pacijenata s NSSKP-om ( $p<0.001$ ).[53] Konzistentnost s potonjim i našim rezultatima osim ovih pokazali su Mu i sur te Sun i sur. u svojim istraživanjima.[29,30] Drugo veliko meta-istraživanje iz 2018. godine sakupilo je 38 studija sa nešto više od 10 000 ispitanika i pokazali su da je povećana ekspresija PD-L1 na tumorskim stanicama povezana s kraćim preživljenjem pacijenata, RFS-om (eng. Relapse free survival) te DFS-om(eng. disease free survival).[54] Visoka heterogenost između istraživanja nađena je prilikom analize duljine preživljenja a srednja heterogenost prilikom analize EFS-a i DFS-a[54]. Kao faktori heterogenosti za RFS istraživači navode histološki tip (zbog malog broja studija), za DFS etničko porijeklo, histološki tip i godina publikacije studije.[54] Za preživljenje, među analiziranim faktorima (geografska lokacija, godina publikacije, veličina uzorka i histološki tip), nije pronađeno značajnih faktora heterogenosti.[54]

Ekspresija PD-L1 na intersticijskim stanicama našeg istraživanja pokazala je pozitivnu korelaciju s gradusom tumora i invazijom pleure, što su značajni pokazatelji lošije prognoze NSSKP-a. Istraživanjem literature nisu pronađena istraživanja koja su u karcinomima pluća-

ne malih stanica procjenjivala ekspresiju intersticijskih (stromalnih) stanica neovisno o vrsti stanica. Takvo istraživanje napravljeno je za karcinome rektuma gdje su Lingdong i sur. [55] povezali povećanu ekspresiju PD-L1 na intersticijskim stanicama s većim patološkim T stadijem tumora (u našem istraživanju imamo  $p=0.055$  za korelaciju PD-L1 u intersticiju centra tumora) te kraćim preživljenjem do lokalnog povrata bolesti (engl. Local recurrence free survival, LFRS), ali ova grupa istraživača intenzitet nije uzimala u obzir.. Također nisu pronađena istraživanja koja su računala H-score ili na drugi način uključila intenzitet obojenja u analizu intersticijskih stanica.

Druga dostupna istraživanja gdje su analizirane intersticijske stanice NSSKP-a procijenjivan je postotak tumora infiltriranog limfocitima koji pokazuju PD-L1 pozitivitet [42] ili količina CD8+ T-limfocita koji se nalaze u intersticiju ili infiltriraju tumorske stanice [22]. Za tumore gdje je 5 i više posto tumorskog tkiva infiltrirano PD-L1 pozitivnim limfocitima pokazana je pozitivna korelacija s višim histološkim gradusom, solidnim tipom tumora i većim brojem cigareta na godinu. [42] Osim ove, studija Andreasa i sur. [56] također je povezala ekspresiju PD-L1 u imunološkim stanicama s pušenjem u anamnezi pacijenata s adenokarcinomom pluća. Nadalje Ameratunga i sur. [22] utvrdili su da količina aktivnih CD8+ limfocita unutar intersticija tumora korelira s duljim DFS i pokazuje trend značajnosti prema duljem preživljenju ( $p=0.096$ ).

Prema smjernicama IASLC-a (eng. International Association for the study of Lung Cancer Publication) za procjenu PD-L1 bojenja [28] preporuča se uključenje procjene postotka obojenih stromalnih stanica NSSKP-a neovisno o intenzitetu pri korištenju SP142 protutijela. Kao stromalne stanice uzimaju sve stanice koje infiltriraju tumorska gnijezda ili se nalaze u neposrednoj blizini istih, što je poštivano i u našem istraživanju. [28] Pokazana je korelacija s boljim odgovorom na atezolizumab te se kao takav već rutinski primjenjuje za liječenje PD-L1 pozitivnog urotelnog karcinoma [28].

U našem istraživanju korišteno je Ventana SP263 PD-L1 protutijelo, tumorske i intersticijske stanice pokazale su i membransko i citoplazmatsko bojenje što je dalo pouzdaniju interpretaciju, jer ukoliko se procjenjuje samo membransko bojenje teško je unutar nakupine tumorskih stanica procijeniti je li obojena membrana samo jedne stanice ili bi trebalo ubrojiti i susjedne stanice.

Korelacija ekspresije PD-L1 ovim protutijelom, nije puno istraživana, no u istraživanju Xiaohua i sur. [57] provedenom na uzorku od 267 tumora ne-malih stanica obojenih Ventana SP263 protutijelom nije nađena korelacija ekspresije PD-L1 na tumorskim stanicama i invazije pleure no statistička značajnost pokazana je kod pojačane ekspresije PD-L1 na tumorskim stanicama adenokarcinoma pluća i limfovaskularne invazije, intersticijske stanice nisu evaluirane u istraživanju.

Uključenje intenziteta preporuča se od strane IASLC-a [28] objavljenih u travnju 2017.-e godine, no premalo je istraživanja koja su interpretirala ekspresiju s obzirom na intenzitet obojenja te intenzitet obojenja nije korišten kao varijabla prilikom kliničkih istraživanja i procjene odgovora na ciljane inhibitore u odnosu na PD-L1 pozitivitet tumora.[28]

Posljedično tome danas se pri izboru pacijenata za specifičnu terapiju blokatorima PD-1/PD-L1 puta u obzir uzima isključivo količina obojenih tumorskih i/ili intersticijskih stanica (ovisi za koji lijek).[28] Dodatna istraživanja se provode kako bi se utvrdila značajnost intenziteta obojenja PD-L1 i izbora pacijenata pogodnih za ciljanu terapiju.

Mnogo istraživanja pokazalo je uspjehe terapije ciljanim blokatorima PD-1/PD-L1 puta u vidu produljenog preživljenja i produljenog EFS u pacijenata s povećanom ekspresijom PD-L1.[14,58,17,59]

Zapravo kako je PD-L1, molekula koju induciraju brojni proupalni citokini [3,59], danas se ekstenzivno istražuje u korelaciji s drugim aktualnim mutacijama u NSSKP. Pokazano je da

ekspresija PD-L1 korelira s ekspresijom EGFR-a [22,60,31,44], KRAS proteina [61,33], te ALK kinaze [59]. Ovakve korelacije također impliciraju značaj PD-L1 u vidu lošije prognoze. Pretpostavlja se da možda ove onkogene mutacije zapravo induciraju ekspresiju PD-L1 u tumorskim stanicama.[12] PD-1/PD-L1 imunološka os samo jedna od mnogih interakcija unutar tumorskog mikrookoliša. Inhibicija istog zaista poboljšava preživljenje što nam govori da ova os ima utjecaj na tumorski rast i širenje. Kontradiktornost rezultata, gore navedenih istraživanja, može se objasniti kroz tumorski mikrookoliš i kompleksne interakcije između mutiranih receptora, drugih imunoloških interakcija unutar mikrookoliša i sl.

Ograničenja ovog istraživanja su: subjektivna, semikvantitativna procjena intenziteta i postotka obojenih stanica unutar TMA. Nadalje, samo je jedna osoba procjenjivala ekspresiju, nema kontrolnog očitavanja koje bi potvrdilo rezultate. Podatci su sakupljeni retrogradno iz dijagnostičko-terapijskih nalaza liječnika za vrijeme obrade pacijenta te su moguća manja odstupanja od realnog stanja. Nehomogena ekspresija PD-L1 u tumorskom tkivu nastojala se objektivizirati uzimanjem 4 TMA po uzorku, no rezultat bi bio vjerodostojniji kada bi se obojao cijeli uzorak korištenjem cijelih rezova umjesto TMA rezova.

PD-L1 definitivno je vrlo važan faktor koji modulira različite karakteristike tumora. Prisutan je u mnogim karcinomima te je zbog toga središte velikog broja istraživanja. Još istraživanja se treba provesti da bi došli do definitivnih saznanja na utjecaj PD-L1 ekspresije i intenziteta ekspresije u korelaciji s kliničko-patoloških karakteristika tumora. Blokada ove imunološke osi nepobitno pokazuje uspjehe kako u NSSKP tako i u liječenju drugih tumora.

U konačnici, smatram da bi izrada baze podataka s kliničkim, etničkim, rasnim i dobnim osobinama pacijenata s NSSKP-om kao i molekularnom profilu tumora mogla rezultirati značajnim zaključcima u ovom području ukoliko bi se razvio algoritam koji bi sam korelirao ove faktore.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Ekspresija PD-L1 je prisutna u tumorskim (TS), ali i intersticijskim (IS) stanicama tumorskog tkiva NSSKP-a različitog intenziteta i postotka obojenosti promatranih stanica što je izraženo kao H-skor TS-a i IS-a.
2. H-score TS-a i IS-a pokazuju statistički značajnu korelaciju, dok nema statistički značaje razlike TS-a i IS-a ukupno kao niti između centra i invazivne fronte tumora.
3. Unutar različitih histoloških tipova NSSKP-a ukupna ekspresija PD-L1 u TS i IS je najmanja u planocelularnim, zatim adenokarcinomima, dok je najveća bila u ostalim tumorima istraživanog uzorka, među kojima prevladavaju velikostanični karcinomi.
4. Prognostički parametri NSSKP-a statistički značajnu povezanost pokazuju s H-skorom ekspresije PD-L1 unutar tumorskih, ali i intersticijskih stanica. Promatrani prognostički parametri u korelaciji s H-skorom obje promatrane populacije stanica su slijedeći: stupanj diferenciranosti tumora, patološki stadij bolesti, klinički stadij proširenosti bolesti. Značajna korelacija H-skora TS-a nađena je u vezi s Ki-67 proliferacijskim indeksom tumora, dok je ekspresija PD-L1 u IS-ma povezana s invazijom pleure.
5. Ekspresija PD-L1 molekule niti u TS-a, niti IS-a nije na statistički značajnoj razini pokazala povezanost s preživljenjem oboljelih od NSSKP-a.

## 7. SAŽETAK

Ne-sitnostanični karcinomi pluća (NSSKP) danas su izrazito učestali s prosječnim petogodišnjim preživljenjem od svega 15%. U ranim stadijima simptomi ovih tumora su blagi i često se dijagnosticiraju u uznapredovalom stadiju kada je uspješnost standardne terapije vrlo ograničena. Posljednjih godina se iz navedenog razloga sve više istraživanja usmjerava prema ciljanoj terapiji usmjerenoj na mutirane EGFR, ALK i dr. receptore i enzime kao i na blokadu različitih imunoloških i neimunoloških interakcija unutar tumorskog mikrookoliša. Ligand programirane stanične smrti-1 (PD-L1) molekula je koja učinak ostvaruje kroz inhibiciju aktivacije i efektorske funkcije različitih imunoloških stanica, dominantno citotoksičnih T limfocita. S druge strane omogućava tumorskim stanicama da izbjegnu prepoznavanje od strane imunološkog sustava domaćina. Brojna istraživanja analizirala su prognostički značaj ekspresije ove molekule te su pokazala uspjehe terapije ciljanim inhibitorima PD-L1 liganda te njemu pridruženog PD-1 receptora.

U našem istraživanju ekspresiju PD-L1 analizirali smo zasebno na tumorskim i intersticijskim stanicama te ju bilježili u vidu H-skora. U obzir je uzet postotak obojenih stanica i intenzitet obojenja. Statistička značajnost pokazana je u razlici ekspresije PD-L1 u različitim histološkim tipovima NSSKP-a. Također je dobivena statistički značajno povećana ekspresija PD-L1 na tumorskim i intersticijskim stanicama s kliničko-patološkim prognostičkim obilježjima NSSKP-a, točnije s gradusom tumora, patološkim i kliničkim stadijem bolesti, proliferacijskim indeksom tumora, te invazijom pleure.

Ovakvi rezultati jasno impliciraju da je ekspresija PD-L1 na tumorskim i intersticijskim stanicama od prognostičke važnosti što je konzistentno s rezultatima drugih istraživanja u ovom području.

Ključne riječi: imunohistokemija; karcinom, ne-sitnostanični pluća; PD-L1; prognoza; tumorski mikrookoliš

## 8. SUMMARY

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is common today with average five year survival rate of just 15%. In early phase, symptoms of these tumors are mild or absent, so they are often diagnosed in advanced stages when effects and success of the standard treatment is oftentimes limited and unsuccessful. Because of that, in recent years, more and more researches are aiming to new ways of treatment. The mutations of EGFR, ALK and other receptors and enzymes are utilized to treat patients but tumor microenvironment, with its different immunological and non-immunological interactions offers a wide spectrum of possibilities for targeted therapy.

Programmed death ligand-1 (PD-L1) is a molecule which function is seen through inhibition of different immune cells, predominantly cytotoxic T-lymphocytes, so that tumor can evade our immune system. Many researchers analysed the prognostic significance of PD-L1 expression on tumor and/or immune cells and showed the positive effects of targeted therapy guided toward blockage of the interaction between PD-L1 and its PD-1 receptor.

In this paper we analysed the expression of PD-L1 on tumor and interstitial cells which was shown as H-score. Statistical significance was shown in correlation of PD-L1 expression and different histologic types of NSCLC. Positive correlation of PD-L1 staining on tumor and interstitial cells was associated with factors that influence the NSCLC prognosis as pathological grade of the tumor, higher pathological and clinical stage, proliferation index of tumor cells and pleural invasion.

These results imply that expression of PD-L1 on tumor and interstitial cells has prognostic significance. This conclusion is consistent with researches regarding this theme.

Keywords: carcinoma, non small cell lung; immunohistochemistry; PD-L1, prognosis; tumor microenvironment

## 9. LITERATURA

1. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2016. Bilten 42, Zagreb, 2017.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2015., Bilten 45, Zagreb, 2018.
3. He J, Hu Y, Hu M, Li B. Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Scientific Reports*. 2015;5(1).
4. Women and Smoking. A Report of the Surgeon General. Washington, DC: United States Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General; 2001.
5. Young RP, Hopkins RJ, Christmas T, Black PN, Metcalf P, Gamble GD. COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history. *EurRespir J*. 2009;34(2):380–386.
6. de Torres JP, Marin JM, Casanova C, i sur. Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Incidence and predicting factors. *Am J RespirCrit Care Med*. 2011;184(8):913–919.
7. Kiri VA, Soriano JB, Visick G, Fabbri LM. Recent trends in lung cancer and its association with COPD: an analysis using the UK GP Research Database. *Prim Care Resp J*. 2010;19(1):57–61
8. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical practice guidelines in oncology, Non-small cell lung cancer. version 4. NCCN; 2018.
9. Ridge C, McErlean A, Ginsberg M. Epidemiology of Lung Cancer. *SeminInterventRadiol*. 2013;30:93-98.



10. Damjanov I, Jukić S, Nola M. Patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2014:4.izdanje; str. 379-417.
11. MSD priručnik dijagnostike i terapije: Karcinom pluća [Internet]. Msd-prirucnici.placebo.hr. 2018 [pristupljeno: 15.6.2018]. Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/pulmologija/tumori-pluca/karcinom-pluca>
12. Ji M, Liu Y, Li Q, Li X, Zhao W, Zhang H i sur. PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13(1):5.
13. Roh M. Molecular Pathology of Lung Cancer: Current Status and Future Directions. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. 2014;77(2):49.
14. Barr Kumarakulasinghe N, Zanwijk N, Soo R. Molecular targeted therapy in the treatment of advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC). *Respirology*. 2015;20(3):370-378.
15. EGFR epidermal growth factor receptor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [pristupljeno: 10.6.2018.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1956>
16. Jorge S, Kobayashi S, Costa D. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in lung cancer: preclinical and clinical data. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2014;47(11):929-939.
17. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, Zhang S, Wang J, Zhou S, Ren S *et al*. Erlotinib versus chemotherapy as first line treatment for patients with advanced EGFR mutation positive non small cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2011; **12**: 735–742.

18. Spyrtos D, Papadaki E, Lampaki S, Kontakiotis T. Chronic obstructive pulmonary disease in patients with lung cancer: prevalence, impact and management challenges. *Lung Cancer: Targets and Therapy*. 2017;Volume 8:101-107.
19. Samaržija M, Jakopović M, Boban M, Bošković L, BelacLovasić I, Juretić A, Gugić D, Radić S i sur. Smjernice za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka pluća ne-malih stanica. *LiječVjesn* 2017;139:365–371.
20. Andreis I, Batinić D, Čulo F i sur. *Imunologija*. 7. Izdanje. Medicinska naklada, Zagreb, 2010.
21. Roche. Ventana PD-L1 (SP 142). Guiding immunotherapy in NSCLC. Brošura. Ventana Medical Systems, Inc. 2016.
22. Ameratunga M, Asadi K, Lin X, Walkiewicz M, Murone C, Knight S i sur. PD-L1 and Tumor Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Markers in Resected NSCLC. *PLOS ONE*. 2016;11(4):e0153954
23. O'Byrne K. Stimulating immune responses to fight cancer: Basic biology and mechanisms. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. 2015;11:9-15.
24. Li J, Jie H, Lei Y, Gildener-Leapman N, Trivedi S, Green T et al. PD-1/SHP-2 Inhibits Tc1/Th1 Phenotypic Responses and the Activation of T Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancer Research*. 2014;75(3):508-518.
25. NCI Dictionary of Cancer Terms. Tumor microenvironment. [pristupljeno 05.06.2018.]. Dostupno na: <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=561725>
26. AACR. The Function of Tumor Microenvironment in Cancer Progression. [pristupljeno: 05.06.2018.] Dostupno na: <http://www.aacr.org/Meetings/Pages/MeetingDetail.aspx?EventItemID=73#.V6pCFPkrKaE>

27. Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, Shi Y, Hu G, Sun Y. BMC Med. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. 2015;13:45.
28. IASLC. IASLC atlas of PD-L1 immunohistochemistry testing in lung cancer. Colorado: Editorial Rx Press; 2017.
29. Mu C, Huang J, Chen Y, Chen C, Zhang X. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. Medical Oncology. 2010;28(3):682-688.
30. Sun J-M i sur. Abstract 8066. 50th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO) - Chicago, Illinois, USA - May 30-June 3, 2014. 2014;39(7):517.
31. Azuma K, Ota K, Kawahara A, Hattori S, Iwama E, Harada T i sur. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. Annals of Oncology. 2014;25(10):1935-1940.
32. Sasaki H, Tatemaysu T, Okuda K, Moriyama S, Yano M, Fuji Y. PD-1 gene promoter polymorphisms correlate with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. Molecular and Clinical Oncology. 2014;2(6):1035-1042.
33. Sumimoto H, Takano A, Teramoto K, Daigo Y. RAS–Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Is Required for Enhanced PD-L1 Expression in Human Lung Cancers. PLOS ONE. 2016;11(11)
34. Zhou J, Gong Z, Jia Q, Wu Y, Yang Z, Zhu B. Programmed death ligand 1 expression and CD8 + tumor-infiltrating lymphocyte density differences between paired primary and brain metastatic lesions in non-small cell lung cancer. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2018;498(4):751-757.

35. Antonia SJ i sur. Association of tumor PD-L1 expression and immune biomarkers with clinical activity in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with nivolumab (Anti-PD-1; BMS-936558; ONO-4538). *J. Thoracic Oncol.* 2013;8:907-908.
36. Kerr KM, Tsao M-S, Nicholson AG, Yatabe Y, Wistuba II, Hirsch FR, et al. PD-L1 immunohistochemistry in lung cancer: in what state is this art? *Journal of Thoracic Oncology*. 9000;Publish Ahead of Print
37. Stoll P, Virchow J, Lommatzsch M. The PD-1–PD-L1 Axis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2016;194(5):644-644.
38. McKendry RT, Spalluto CM, Burke H, Nicholas B, Cellura D, Al-Shamkhani A i sur. Dysregulation of antiviral function of CD8+ T cells in the chronic obstructive pulmonary disease lung: role of the PD-1–PD-L1 axis. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:642–651.
39. Schildgen V, Nenadic I, Brockmann M, Schildgen O. Diagnostics for Targeted NSCLC Therapy. *Challenges*. 2017;8(2):29.
40. Travis WD, Brambilla E i sur. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors *Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification*. *J Thorac Oncol*. 2015;10: 1243–1260
41. Shao L, Peng Q, Du K, He J, Dong Y, Lin X i sur. Tumor cell PD-L1 predicts poor local control for rectal cancer patients following neoadjuvant radiotherapy. *Cancer Management and Research*. 2017;Volume 9:249-258
42. Driver B, Miller R, Miller T, Deavers M, Gorman B, Mody D i sur. Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Expression in Either Tumor Cells or Tumor-Infiltrating Immune Cells Correlates With Solid and High-Grade Lung Adenocarcinomas. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2017;141(11):1529-1532.

43. Takada K, Okamoto T, Toyokawa G, Kozuma Y, Matsubara T, Haratake N i sur. The expression of PD-L1 protein as a prognostic factor in lung squamous cell carcinoma. *Lung Cancer*. 2017;104:7-15.
44. Sterlacci W, Fiegl M, Drosner R, Tzankov A. Expression of PD-L1 Identifies a Subgroup of More Aggressive Non-Small Cell Carcinomas of the Lung. *Pathobiology*. 2016;83(5):267-275.
45. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M i sur. Programmed deathligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Laboratory Investigation*. 2013; 94(1):107-116.
46. Cooper WA, Tran T, Vilain RE, Madore J, Selinger CI, Kohonen-Corish M i sur. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer*. [pristupljeno 15.6.2018.].Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.05.007>
47. Gao Q, Wang X, Qiu S, Yamato I, Sho M, Nakajima Y i sur. Overexpression of PD-L1 Significantly Associates with Tumor Aggressiveness and Postoperative Recurrence in Human Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(3):971-979.
48. Thompson R, Leibovich B, Dong H, Lohse C, Webster W, Zincke H i sur. B7-H1 is Associated with Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma Patients with Long Term Follow-Up. *The Journal of Urology*. 2006;175(4):126.
49. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K i sur. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(9):3360-3365.

50. Muenst S, Schaerli A, Gao F, Däster S, Trella E, Droeser R i sur. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2014;146(1):15-24.
51. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2006;56(8):1173-1182.
52. Rüschoff J, Kerr KM, Grote HJ i sur. Reproducibility of immunohistochemical scoring for epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer: round robin test. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Sep;137(9):1255-1261.
53. Wang A, Wang HY, Liu Y i sur. The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(4):450-456.
54. Soo R, Chen Z, Teng R, Tan H, Iacopetta B, Tai B i sur. Prognostic significance of immune cells in non-small cell lung cancer: meta-analysis. *Oncotarget*. 2018;9(37)
55. Mino-Kenudson M, Mino-Kenudson M. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression by immunohistochemistry: could it be predictive and/or prognostic in non-small cell lung cancer?. *Cancer Biology & Medicine*. 2016;13(2):157-170.
56. Scheel A, Ansén S, Schultheis A, Scheffler M, Fischer R, Michels S i sur. PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Correlations with genetic alterations. *OncoImmunology*. 2016;5(5)
57. Shi X, Wu S, Sun J, Liu Y, Zeng X, Liang Z. PD-L1 expression in lung adenosquamous carcinomas compared with the more common variants of non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*. 2017;7.

58. Barr Kumarakulasinghe N, Zanwijk N, Soo R. Molecular targeted therapy in the treatment of advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC). *Respirology*. 2015;20(3):370-378.
59. Keith MK, Nicolson MC. Non-Small Cell Lung Cancer, PD-L1, and the Pathologist. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140;249-253.
60. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, Altabef A, Tchaicha JH, Christensen CL i sur. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov*. 2013;3:1355–63.
61. Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N i sur.: Programmed Cell Death 1 (PD-1) and Its Ligand (PD-L1) in Common Cancers and Their Correlation with Molecular Cancer Type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014.

## 10. ŽIVOTOPIS

Petra Pupić-Bakrač rođena je 13. listopada 1993. godine. U Rijeci pohađa Osnovnu školu Vladimira Gortana te s drugim polugodištem sedmog razreda, svoje školovanje nastavlja u Osnovnoj školi Šimuna Kožičića Benje u Zadru. Obrazovanje nastavlja u Gimnaziji Franje Petrića u Zadru, gdje 2012. godine završava program općeg smjera. Prvu godinu Medicinskog fakulteta u Rijeci upisuje u akademskoj godini 2012/2013. te isti završava u roku 2017/2018. akademske godine

Za vrijeme studija tijekom četvrte, pete i šeste godine obavlja demonstrature na Katedri za opću patologiju i patološku anatomiju, od kojih posljednje dvije godine obnaša funkciju voditelja demonstratora. Na istom Zavodu u istom periodu prvih godinu dana surađuje na projektu „Uloga osteopontina u progresiji tumora“ i to prvu godinu sa prof. dr. sc. Ksenijom Jurinović, koja je i nositelj projekta, u segmentu vezanome za B-velikostanični limfom, a daljnje dvije godine s doc. dr. sc. Koveljkom Matušan Ilijaš vezanome uz tumorski mikrookoliš ne-sitnostaničnog karcinoma pluća.

Radi za firmu Cromedic kao prva pomoć na događanjima i festivalima u vrijeme ljeta 2017. godine te u nadolazećem ljetu 2018. godine.

U akademskoj godini 2016/17., kao dio tima Solucija, osvaja prvo mjesto na case-study natjecanju Realizator rješavajući problem zadan od strane KBC-a Rijeka, dok godinu poslije na istom natjecanju, s Timom osvaja prvo i drugo mjesto predloženim rješenjem na problemski zadatak zadan od firme JGL d.o.o. te JU Prirode.

U slobodno vrijeme proučava akupunkturu i trenira taichi.



## DODATAK 1:

### Tablica TNM-klasifikacije ne-sitnostaničnog karcinoma pluća [19]

Tablica – Table 1. *TNM-klasifikacija raka pluća nemalih stanica / Non-small cell lung cancer TNM classification*

| Deskriptori T, N i M 8. izdanja TNM-klasifikacije raka pluća / T, N and M descriptors for the eighth edition of TNM classification for lung cancer |  |                     |     |
|--|--|---------------------|-----|
| <i>T: primarni tumor / T: primary tumor</i>  |  |                     |     |
| Tx   | ne može se procijeniti prisutnost primarnog tumora ili tumor koji je dokazan prisutnošću zloćudnih stanica u sputumu ili ispirku bronha, ali se ne može vizualizirati slikovnim metodama ili bronhoskopijom / primary tumor cannot be assessed or tumor proven by presence of malignant cells in sputum or bronchial washings but not visualized by imaging or bronchoscopy  |                     |     |
| T0   | bez dokaza primarnog tumora / no evidence of primary tumor   |                     |     |
| Tis  | karcinom <i>in situ</i> / carcinoma <i>in situ</i>   |                     |     |
| T1   | tumor ≤ 3 cm u najvećem promjeru okružen plućima ili visceralnom pleurom bez bronhoskopskog dokaza invazije proksimalno od lobarnog bronha (npr., tumor nije vidljiv u glavnom bronhu) / tumor ≤ 3 cm in greatest dimension surrounded by lung or visceral pleura without bronchoscopic evidence of invasion more proximal than the lobar bronchus (i.e., not in the main bronchus)  |                     |     |
| T1a(mi)  | minimalno invazivni karcinom / minimally invasive adenocarcinoma   |                     |     |
| T1a  | tumor ≤ 1 cm u najvećem promjeru / tumor ≤ 1 cm in greatest dimension  |                     |     |
| T1b  | tumor > 1 cm, ali ≤ 2 cm u najvećem promjeru / tumor > 1 cm but ≤ 2 cm in greatest dimension   |                     |     |
| T1c  | tumor > 2 cm, ali ≤ 3 cm u najvećem promjeru / tumor > 2 cm but ≤ 3 cm in greatest dimension   |                     |     |
| T2   | tumor > 3 cm, ali ≤ 5 cm ili tumor s bilo kojom od navedenih značajka: zahvaća glavni bronh neovisno o udaljenosti od karine, ali ne zahvaća karinu, invadira visceralnu pleuru, povezan je s atelektazom ili opstruktivnim pneumonitisom koji se širi u hilarnu regiju te zahvaća dio ili cijelo pluće / tumor > 3 cm but ≤ 5 cm or tumor with any of the following features: involves main bronchus regardless of distance from the carina but without involvement of the carina; invades visceral pleura; associated with atelectasis or obstructive pneumonitis that extends to the hilar region, involving part or all of the lung                        |                     |     |
| T2a  | tumor > 3 cm, ali ≤ 4 cm u najvećem promjeru / tumor > 3 cm but ≤ 4 cm in greatest dimension   |                     |     |
| T2b  | tumor > 4 cm, ali ≤ 5 cm u najvećem promjeru / tumor > 4 cm but ≤ 5 cm in greatest dimension   |                     |     |
| T3   | tumor > 5 cm, ali ≤ 7 cm u najvećem promjeru ili prisutnost odvojenih tumorskih čvorova u istom režnju kao i primarni tumor ili tumor koji direktno zahvaća bilo koju od ovih struktura: stijenku prsnog koša (uključujući parijetalnu pleuru i tumore gornjeg sulkusa), frenički živac, parijetalni perikard / tumor > 5 cm but ≤ 7 cm in greatest dimension or associated with separate tumor nodule(s) in the same lobe as the primary tumor or directly invades any of the following structures: chest wall (including the parietal pleura and superior sulcus T1 tumors), phrenic nerve, parietal pericardium   |                     |     |
| T4   | tumor > 7 cm u najvećem promjeru ili prisutnost odvojenih tumorskih čvorova u različitim režnju ipsilateralnog pluća kao i primarni tumor ili tumor koji direktno zahvaća bilo koju od ovih struktura: ošit, medijastinum, srce, velike krvne žile, traheju, nervus laryngeus recurrens, jednjak, kralježnicu i karinu / tumor > 7 cm in greatest dimension or presence of separate tumor nodules in a different ipsilateral lung lobe than that of the primary tumor or tumor which directly invades any of the following structures: diaphragm, mediastinum, heart, great vessels, trachea, recurrent laryngeal nerve, esophagus, vertebral body, and carina |                     |     |
| <i>N: zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova / N: regional lymph node involvement</i>   |  |                     |     |
| Nx   | ne može se procijeniti jesu li zahvaćeni regionalni limfni čvorovi / regional lymph nodes cannot be assessed   |                     |     |
| N0   | nema rasadnica u regionalne limfne čvorove / no regional lymph node metastasis   |                     |     |
| N1   | rasadnice u ipsilateralne peribronhale i/ili ipsilateralne hilarne limfne čvorove i intrapulmonarne čvorove, uključujući i direktnu zahvaćenost / metastasis in ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar lymph nodes and intrapulmonary nodes, including involvement by direct extension   |                     |     |
| N2   | rasadnice u ipsilateralne medijastinalne i/ili suprakarinalne limfne čvorove / metastasis in ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph node(s)   |                     |     |
| N3   | rasadnice u kontralateralne medijastinalne, kontralateralne hilarne, ipsilateralne ili kontralateralne skalenske ili supraklavikularne limfne čvorove / metastasis in contralateral mediastinal, contralateral hilar, ipsilateral or contralateral scalene, or supraclavicular lymph node(s)   |                     |     |
| <i>M: udaljene rasadnice / M: distant metastasis</i>   |  |                     |     |
| M1   | prisutne udaljene rasadnice / no distant metastasis  |                     |     |
| M1a  | odvojeni tumorski čvorovi u kontralateralno pluće; tumor s pleuralnim ili perikardijalnim čvorovima ili maligni pleuralni ili perikardijalni izljev / separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe; tumor with pleural or pericardial nodule(s) or malignant pleural or pericardial effusion   |                     |     |
| M1b  | jedna ekstratorakalna rasadnica / single extrathoracic metastasis  |                     |     |
| M1c  | multiple ekstratorakalne rasadnice u jedan ili više organa / multiple extrathoracic metastases in one or more organs   |                     |     |
| <i>Stadiji raka pluća prema TNM-deskriptorima / Overall stage</i>  |  |                     |     |
| Okultni rak / Occult carcinoma   | Tx   | N0                  | M0  |
| Stadij 0 / Stage 0   | Tis  | N0                  | M0  |
| Stadij IA1 / Stage IA1   | T1a(mi)  | N0                  | M0  |
|  | T1a  | N0                  | M0  |
| Stadij IA2 / Stage IA2   | T1b  | N0                  | M0  |
| Stadij IA3 / Stage IA3   | T1c  | N0                  | M0  |
| Stadij IB / Stage IB   | T2a  | N0                  | M0  |
| Stadij IIA / Stage IIA   | T2b  | N0                  | M0  |
| Stadij IIB / Stage IIB   | T1a – c  | N1                  | M0  |
|  | T2a  | N1                  | M0  |
|  | T2b  | N1                  | M0  |
|  | T3   | N0                  | M0  |
| Stadij IIIA / Stage IIIA   | T1a – c  | N2                  | M0  |
|  | T2a – b  | N2                  | M0  |
|  | T3   | N1                  | M0  |
|  | T4   | N0                  | M0  |
|  | T4   | N1                  | M0  |
| Stadij IIIB / Stage IIIB   | T1a – c  | N3                  | M0  |
|  | T2a – b  | N3                  | M0  |
|  | T3   | N2                  | M0  |
|  | T4   | N2                  | M0  |
| Stadij IIIC / Stage IIIC   | T3   | N3                  | M0  |
|  | T4   | N3                  | M0  |
| Stadij IVA / Stage IVA   | bilo koji T / any T  | bilo koji N / any N | M1a |
|  | bilo koji T / any T  | bilo koji N / any N | M1b |
| Stadij IVB / Stage IVB   | bilo koji T / any T  | bilo koji N / any N | M1c |

## DODATAK 2:

Tablica: Pregled studija objavljenih na temu PD-L1 ekspresije u ovisnosti s istraživanim uzorkom, korištenim klonom PD-L1 protutijela za prikaz ekspresije, *cut-off* vrijednosti za pozitivitet, te rezultatima [28]

Table 3. Reported studies of PD-L1 in NSCLC.

| Author         | Year | N         | Population                             | PDL1 assay                   | PD-L1% | Cutoff % | Findings   |
|----------------|------|-----------|--|------------------------------|--------|----------|--|
| Taube [31]     | 2014 | 41        | Mixed histology                        | 5H1, M3                      | 53     | 5        | Associated with TILs Predict response to chemotherapy  |
| Azuma[44]      | 2014 | 164 NSCLC | Asian 57% EGFR mutated Stage I-III     | Lifespan Bio-sciences        |        | Median   | Associated with AC histology & EGFR mutation.  |
| Konishi[40]    | 2004 | 52        | Asian Stage I-III                      | M1H1                         |        | Median   | No relationship to clinical outcomes observed  |
| Kim[45]        | 2015 | 331 SCC   | Asian Stage I-III                      | Cell Signalling              | 27     | 10       | Correlated with CD8+ TILs Not associated with survival CD8+ TILs correlated with improved survival |
| D'Incecco [33] | 2015 | 125 NSCLC | Stage IV Italian                       | Abcam                        | 55     | 5        | Associated with AC histology, EGFR mutation.   |
| Boland[46]     | 2013 | 214 SCC   | Caucasian Stage I-IV                   | Dako                         | 19     | 1        | No relationship to clinical outcomes observed.   |
| Zhang[30]      | 2014 | 143 AC    | Asian Stage I-III                      | Sigma-Aldrich                |        | Median   | Worse survival outcomes if PD-L1 positive  |
| Velcheti [41]  | 2013 | 544 NSCLC | 2 cohorts Caucasian & Greek Stage I-IV | Dr. Lieping Chen's lab (5H1) | 26, 35 |          | Correlated with TILs Improved OS with PD-L1 expression (independent)                               |
| Yang[47]       | 2014 | 163 AC    | Stage I Asian                          | Proteintech                  | 40     | 5        | Improved DFS PD-L1 positive No improved OS but very few deaths                                     |
| Cooper[42]     | 2015 | 681 NSCLC | Caucasian Stage I-III                  | Merck                        | 8      | 50       | Improved OS PD-L1 positive in SCC, not in AC.  |
| Schmidt        | 2015 | 321 NSCLC | Caucasian Stage I-III                  | Cell Signalling              | 24     | 5        | Improved OS PD-L1 positive in SCC, adjuvant therapy, T2-T4 and N1-N3 disease.                      |

AC adenocarcinoma; SCC squamous cell carcinoma; NSCLC non-small cell lung cancer; OS overall survival; DFS disease free survival; EGFR epidermal growth factor receptor; TILs tumor infiltrating lymphocytes.

doi:10.1371/journal.pone.0153954.t003

### DODATAK 3:

Tablica: Rezultati kliničkih istraživanja ciljanih blokatora PD-1/PD-L1 imunološke osi u pacijenata s uznapredovalim ne-sitnostaničnim karcinomima pluća.[28]

| Study                   | Trial Phase  | Treatment Line  | Histologic Subtype | Drug                     | ORR (%)        | Progression-free Survival |                 |               | Overall Survival                     |               |
|-------------------------|--------------|-----------------|--------------------|--------------------------|----------------|---------------------------|-----------------|---------------|--------------------------------------|---------------|
|                         |              |                 |                    |                          |                | No. of Mos. (95% CI)      | At 24 Weeks (%) | At 1 Year (%) | No. of Mos. (95% CI)                 | At 1 Year (%) |
| <b>PD-1 Inhibitors</b>  |              |                 |                    |                          |                |                           |                 |               |                                      |               |
| Gettinger 2016          | Phase I      | Second or more  | Sq and nonaq       | Nivolumab                | 17.1           | 2.3 (1.8-3.7)             | 33              | 22            | 9.9 (7.8-12.4)                       | 42            |
| Rizvi 2015a             | Phase II     | Third or more   | Sq                 | Nivolumab                | 14.5 (partial) | 1.9 (1.8-3.2)             | 25.9            | 20            | 8.2 (6.1-10.9)                       | 41            |
| Takeda 2015             | Phase II     | Second          | Sq and-nonsq       | Nivolumab                | 25.7           | 4.2 (1.5-7.1)             | NR              | NR            | Not reached (12.4-not reached)       | NR            |
| Hussein 2015            | Phase II     | Second or more  | Sq and nonsq       | Nivolumab                | 12             | NR                        | NR              | NR            | NR                                   | NR            |
| Brahmer 2015            | Phase III    | Second          | Sq                 | Nivolumab                | 20             | 3.5 (2.1-4.9)             | NR              | 21            | 9.2 (7.3-13.3)                       | 42            |
|                         |              |                 |                    | Docetaxel                | 9              | 2.8 (2.1 -3.5)            | NR              | 6             | 6.0 (5.1-7.3)                        | 24            |
| Borghaei 2015           | Phase III    | Second          | Nonsq              | Nivolumab                | 19             | 2.3                       | NR              | 19            | 12.2 (9.7-15.0)                      | 51            |
|                         |              |                 |                    | Docetaxel                | 12             | 4.2                       | NR              | 8             | 9.4 (8.1-10.7)                       | 39            |
| Socinski 2016           | Phase III    | First           | Sq and nonsq       | Nivolumab                | 26.1           | 4.2                       | NR              | 23.6          | 14.4                                 | 56.3          |
|                         |              |                 |                    | Platinum doublet         | 33.5           | 5.9                       | NR              | 23.2          | 13.2                                 | 53.6          |
| Garon 2015              | Phase I      | Any             | Sq and nonsq       | Pembrolizumab            | 19.4           | 3.7 (2.9-4.1)             | NR              | NR            | 12.0 (9.3-14.7)                      | NR            |
| Herbst 2016             | Phase II/III | Second or more  | Sq and nonsq       | Pembrolizumab (2 mg/kg)  | 18             | 3.9                       | NR              | NR            | 10.4 (9.4-11.9)                      | 43.2          |
|                         |              |                 |                    | Pembrolizumab (10 mg/kg) | 18.5           | 4.0                       | NR              | NR            | 12.7 (10.0-17.3)                     | 52.3          |
|                         |              |                 |                    | Docetaxel                | 9.3            | 4.0                       | NR              | NR            | 8.5 (7.5-9.8)                        | 34.6          |
| Reck 2016               | Phase III    | First           | Sq and nonq        | Pembrolizumab            | 44.8           | 10.3                      | 62.1            | NR            | Not reached                          | NR            |
|                         |              |                 |                    | Platinum doublet         | 27.8           | 6.0                       | 50.3            | NR            | Not reached                          | NR            |
| <b>PD-L1 Inhibitors</b> |              |                 |                    |                          |                |                           |                 |               |                                      |               |
| Herbst 2014             | Phase I      | Any             | Sq and nonsq       | Atezolizumab             | 23             | 15 weeks                  | 44.7            | NR            | NR                                   | NR            |
| Spigel 2015             | Phase II     | Second or more  | Sq and nonsq       | Atezolizumab             | 16             | 2.7                       | 32              | NR            | 10.6 (5.8-NR)                        | 48            |
| Fehrenbacher 2016       | Phase II     | Second or third | Sq and nonsq       | Atezolizumab             | 14.6           | 2.7                       | NR              | NR            | 12.6                                 | NR            |
|                         |              |                 |                    | Docetaxel                | 14.7           | 3.0                       | NR              | NR            | 9.7                                  | NR            |
| Barlesi 2016            | Phase III    | Second or third | Sq and nonsq       | Atezolizumab             | 14             | 2.8                       | NR              | NR            | 13.8                                 | 55            |
|                         |              |                 |                    | Docetaxel                | 13             | 4.0                       | NR              | NR            | 9.6                                  | 41            |
| Rizvi 2015              | Phase I      | Any             | Sq and nonsq       | Durvalumab               | 14             | NR                        | NR              | NR            | PD-L1+: not reached<br>PD-L1-ve: 8.9 | NR            |
| Verschraegen 2016       | Phase Ib     | First           | Sq and nonsq       | Avelumab                 | 18.7           | 11.6 weeks                | 35.6            | NR            | NR                                   | NR            |

ORR = objective response rate; Sq = squamous; Nonsq = nonsquamous; NR = not reported.

## DODATAK 4:

Tablica: Odabrani inhibitorni i stimulatorni ciljani lijekovi usmjereni na PD-1/PD-L1 imunološku os [S]

| Target                    | Agent                    | Stage of Development in NSCLC | Manufacturer             |
|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| <b>Inhibitory Agents</b>  |                          |                               |                          |
| CTLA-4                    | Ipilimumab               | Phase III                     | Bristol-Myers Squibb     |
|                           | Tremelimumab             | Phase III                     | AstraZeneca/MedImmune    |
| PD-1                      | Nivolumab (BMS936558)    | Approved by US FDA            | Bristol-Myers Squibb/ONO |
|                           | Pembrolizumab (MK-3475)  | Approved by US FDA            | Merck                    |
|                           | Pidilizumab (CT-011)     | Phase I-II                    | Cure Tech/Teva           |
|                           | PDR001                   | Phase I-II                    | Novartis                 |
| PD-L1                     | Atezolizumab (MPDL3280A) | Approved by US FDA            | Genentech                |
|                           | Durvalumab (MEDI4736)    | Phase III                     | AstraZeneca/MedImmune    |
|                           | Avelumab (MSB0010718C)   | Phase III                     | Pfizer/Merck Serono      |
| LAG3                      | LAG525                   | Phase I-II                    | Novartis                 |
| KIR                       | Lirilumab                | Phase I-II                    | Bristol-Myers Squibb     |
| <b>Stimulatory Agents</b> |                          |                               |                          |
| OX40                      | MEDI0562                 | Phase I                       | AstraZeneca/MedImmune    |
|                           | MEDI6383                 | Phase I                       | AstraZeneca/MedImmune    |
|                           | MOXR0916                 | Phase I                       | Genentech                |
| 4-1BB                     | Utomilumab (PF-05082566) | Phase I                       | Pfizer                   |
|                           | Urelumab (BMS- 663513)   | Phase I-II                    | Bristol-Myers Squibb     |
| GITR                      | MK-4166                  | Phase I                       | Merck                    |

CTLA-4 = cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4; PD-1 = programmed cell death protein-1; PD-L1 = programmed cell death ligand-1; FDA = Food and Drug Administration; LAG3 = lymphocyte-activation gene 3; KIR = killer-cell immunoglobulin-like receptor; GITR = glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor.

Bristol-Myers Squibb, New York, USA; AstraZeneca, Cambridge, UK; MedImmune, Gaithersburg, Maryland, USA; ONO Pharmaceutical Co., LTD, Osaka, Japan; Merck, Kenilworth, New Jersey, USA; Cure Tech, Yavne, Israel; Teva Pharmaceutical Industries, Ltd, Petach Tikva, Israel; Novartis International AG, Basel, Switzerland; Genentech, South San Francisco, USA, Pfizer Oncology, New York, USA; Merck Serono, Darmstadt, Germany.