

# Uloga tumorskog mikrookoliša u progresiji ne-sitnostaničnog karcinoma pluća

---

**Božičević, Patricia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:184:215619>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*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

Patricia Božičević

ULOGA TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA U PROGRESIJI NE-SITNOSTANIČNOG  
KARCINOMA PLUĆA

Diplomski rad

Rijeka, 2020

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

Patricia Božičević

ULOGA TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA U PROGRESIJI NE-SITNOSTANIČNOG  
KARCINOMA PLUĆA

Diplomski rad

Rijeka, 2020

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

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

\_\_\_\_\_

pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Emina Babarović
2. doc. dr. sc. Ita Hadžisejdić
3. prof. dr. sc. Ines Mrakovčić-Šutić

Rad sadrži: 50 stranica, 12 slika, 3 tablice i 56 literaturnih navoda.

# 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.	PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE I KLASIFIKACIJA TUMORA PLUĆA.....	4
1.1.5.	MOLEKULARNI PROFIL TUMORA PLUĆA .....	6
1.1.5.	ODREĐIVANJE STADIJA I STANDARDNO LIJEČENJE TUMORA PLUĆA .....	10
1.2.	TUMORSKI MIKROOKOLIŠ .....	12
1.2.1.	ULOGA TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA .....	12
1.2.2.	ZNAČAJ STANICA IMUNOLOŠKOGA SUSTAVA U TUMORSKOM MIKROOKOLIŠU .....	14
1.2.3.	FUNKCIJA PD-1 I PD-L1 MOLEKULA U TUMORSKOM MIKROOKOLIŠU.....	16
1.2.4.	EKSPRESIJA PD-1 I PD-L1 U TUMORSKOM TKIVU I KLINIČKI ZNAČAJ .....	17
1.2.5.	M1 I M2 MAKROFAZI I NJIHOVA FUNKCIJA .....	20
1.2.6.	EKSPRESIJA M1 I M2 MAKROFAGA U TUMORSKOM TKIVU I KLINIČKI ZNAČAJ .....	22
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	23
3.	ISPITANICI, MATERIJALI I POSTUPCI .....	24
3.1.	ISPITANICI I MATERIJALI .....	24
3.2.	POSTUPCI.....	25
3.2.1.	ODREĐIVANJE PROGNOСТИČKIH FAKTORA .....	25
3.2.2.	IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE .....	26
3.2.3.	ODREĐIVANJE PROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI .....	27
3.2.4.	ODREĐIVANJE EKSPRESIJE PD-1 MOLEKULE .....	27
3.2.5.	ODREĐIVANJE POSTOTKA M1 MAKROFAGA U TUMORSKOJ STROMI .....	27
3.2.6.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	28
4.	REZULTATI .....	28
4.1.	KLINIČKOPATOLOŠKA OBILJEŽJA SUDIONIKA.....	28
4.2.	POVEZANOST PD-1 EKSPRESIJE I KLINIČKOPATOLOŠKIH OBILJEŽJA .....	30
4.3.	POVEZANOST HLA-DR EKSPRESIJE I KLINIČKOPATOLOŠKIH OBILJEŽJA .....	31
5.	RASPRAVA .....	35
6.	ZAKLJUČCI .....	40
7.	SAŽETAK .....	41
8.	SUMMARY .....	42
9.	LITERATURA.....	43
10.	ŽIVOTOPIS .....	50

## **POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA**

AJCC - American Joint Committee on Cancer

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

APC – antigen predočavajuće stanice (od engl. Antigen presenting cell)

CAF – fibroblasti povezani s tumorom (cancer associated fibroblasts)

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

EM – ekstracelularni matriks

EML4 – fuzijski gen (od engl. Echinoderm microtubule-associated protein-like 4)

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

LPS – lipopolisaharid

MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza

MDSC - supresijske stanice mijeloidnog podrijetla (engl. myeloid derived supresor cells)

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

NCAM = adhezijska molekula neuralnih stanica (od engl. neural cell adhesion molecule)

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)

SIADH – sindrom neprimjerenog lučenja antidiuretskog hormona (od engl. Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone Secretion)

TAM – makrofazi povezani s tumorom (od engl. Tumor associated macrophags)

TGF –  $\beta$  – transformacijski faktor rasta  $\beta$  (od engl. Transformation growth factor  $\beta$ )

TIL - tumor infiltrirajući limfociti

TLR – receptori makrofaga (od engl. Toll like receptor)

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

TTF1 - tireoidni transkripcijski faktor 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

Maligne bolesti predstavljaju značajan javnozdravstveni problem u Republici Hrvatskoj i u svijetu. Podatci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo pokazuju da je 2017. godine u Republici Hrvatskoj zabilježeno 24 385 novih slučajeva zloćudnih bolesti, što nam govori da je incidencija malignih oboljenja iznosila 591,2/100 000. Stopa mortaliteta iste godine iznosila je 330,7/100 000 [1].

Zloćudne novotvorine traheje, bronha i pluća treći su vodeći uzrok smrti u Republici Hrvatskoj te najčešći uzrok smrti od malignih bolesti, pri čemu češće izazivaju smrt u muškaraca [2].

90-95% tumora pluća čine karcinomi, koje dijelimo u dvije velike skupine - sitnostanični karcinom pluća i ne-sitnostanični karcinomi pluća [3].

Čimbenici rizika koji pogoduju razvoju karcinoma pluća mogu se podijeliti u promjenjive i nepromjenjive čimbenike rizika. Najznačajniji neovisni čimbenik rizika je izloženost duhanskom dimu, uključujući pasivno pušenje. Pretpostavlja se da pušenje duhana uzrokuje oko 80-90% svih karcinoma pluća. Osim pušenja na razvoj karcinoma pluća može utjecati i industrijsko onečišćenje zraka. Češće se javlja kod osoba koje su bile izložene azbestu, niklu, kromu, arsenu, destilatima ugljena i nafte te radonu [4].

Na razvoj tumora pluća utječu i neki nepromjenjivi čimbenici rizika. Tu je među prvima bitno spomenuti genetsku predispoziciju. Nadalje, karcinomi pluća češće se javljaju u osoba starije životne dobi i češći su kod osoba muškoga spola [5].



### 1.1.2. KLINIČKA SLIKA TUMORA PLUĆA

Oko 25% karcinoma pluća je asimptomatsko te se otkriva slučajno, prilikom snimanja grudnih organa. Simptomatologija karcinoma pluća najviše ovisi o njihovoj lokalizaciji i proširenosti. Lokalno tumor može vršiti pritisak na bronhe te na taj način uzrokovati kašalj, a rjeđe dispneju. Zbog iritacije sluznice može se manifestirati i hemoptizom. Nadalje, može uzrokovati atelektazu distalno od mjesta opstrukcije i post-opstruktivnu pneumoniju praćenu kašljem i vrućicom [6].

Tumor koji raste apikalno može pritiskati živčani splet i izazvati Hornerov sindrom koji se očituje enoftalmusom, ptozom, anhidrozom i miozom [3].

Lokalno širenje tumora i zahvaćanje pleure može uzrokovati pleuralnu bol ili dispneja uslijed pleuralnog izljeva, a radi prodora tumora u nervus recurrens javlja se promuklost. Nerijetko prilikom širenja tumor može zahvatiti gornju šuplju venu i izazvati sindrom vene cave superior (otok i crvenilo lica, vrata i gornjih udova te nabrekle potkožne vene na licu i gornjem dijelu trupa). Karcinomi pluća često metastaziraju, hematogeno i limfogeno.

Limfogeno se najčešće šire u okolne traheobronhalne, cervikalne, aksilarne, supraklavikularne ili mezenterijalne limfne čvorove. Hematogenim rasapom tumori pluća najčešće metastaziraju u nadbubrežnu žljezdu, jetru, mozak, kosti i bubrege. Tumori koji su metastazirali uzrokuju simptome ovisne o lokalizaciji samih metastaza [6].

Tumori pluća relativno često luče različite hormone i druge biološki aktivne tvari te time uzrokuju paraneoplastični sindrom koji se javlja u otprilike 5% pacijenata, najčešće u sklopu sitnostaničnog karcinoma pluća te se najčešće prezentirata kao hiperkalcijemija ili sindrom neodgovarajućeg izlučivanja antidiuretskog hormona (SIADH) [3,7].

### 1.1.3. DIJAGNOSTIKA TUMORA PLUĆA

Sumnja na neoplazmu pluća postavlja se temeljem anamneze i kliničkog pregleda. U prvome kontaktu bitni su simptomi i anamnestički podatci koji nam govore u prilog izloženosti čimbenicima rizika [6].

Dijagnostika karcinoma pluća temelji se na slikovnim metodama, među kojima je prva metoda dijagnostike, RTG srca i grudnih organa, zbog široke dostupnosti.

Na radiološkoj snimci karcinom pluća najčešće se prezentira u obliku zasjenjenja pluća, što nije specifični znak maligne promijene no može nam dati razlog za dodatnu obradu. Ponekad se može prezentirati i u obliku nodalnih masa, a mogu se vidjeti i neke popratne pojave, kao što su atelektaze, pleuralni izljevi i slično [8].

U daljnju obradu uključuje se kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije (HRCT) čija je glavna prednost visoka rezolucija i mogućnost evaluacije cijelog toraksa. HRCT je izrazito bitan jer povećava mogućnost detekcije nodoznih promjena <5mm [8,9].

U dijagnostici također se može koristiti magnetska rezonanca (MR). Njegove prednosti nad HRCT-om su bolji kontrasti mekog tkiva, mogućnost multiplanarog imaginga i mogućnost izuzimanja srčane sjene. No, međutim, zbog veće dostupnosti CT uređaja, MR se uglavnom koristi samo za razjašnjavanje graničnih slučajeva [8].

PET CT je izrazito senzitivna u otkrivanju maligniteta, a njegova prednost je i što se može u jednom pregledu skenirati cijelo tijelo. Najčešće se rabi kod određivanja stadija karcinoma pluća odnosno za detekciju metastatskog procesa [8].

U dijagnostičkom procesu mogu se odrediti i tumorski markeri. U prilog postojanju planocelularnog karcinoma govore nam visoke razine CYFRA21-1 tumorskog biljega. ProGRP i NSE su tumorski markeri povezani sa sitnostaničnim karcinomom dok je CEA povezan s adenokarcinomom.

Definitivna dijagnoza postavlja se citološkim pregledom stanica ili patohistološkim pregledom tkiva. Citološki pregled sputuma ili pleuralne tekućine je najmanje invazivna metoda. Nadalje, kod lokaliziranih metastaza (u okolnim limfnim čvorovima) može se učiniti perkutana biopsija. Ukoliko je tumor operabilan uzorak se dobije resekcijom tokom operacije i šalje na patohistološki pregled. Kod neoperabilnih tumora način uzimanja citološkog i histološkog uzroka najviše ovisi o lokalizaciji. Kod centralnih tumora uzorak se uzima prilikom bronhoskopije dok se kod periferno smještenih tumora uzorak uglavnom dobiva CT-om vođenom transtorakalnom biopsijom [6].

Citološkim ili patohistološkim pregledom, te dodatnom imunohistokemijskom (IH) odnosno molekularnom analizom tumora, određuje se njegova vrsta te patohistološke karakteristike [6].

#### 1.1.4. PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE I KLASIFIKACIJA TUMORA PLUĆA

Prema patohistološkim karakteristikama karcinomi pluća dijele se u dvije velike grupe: sitnostanične karcinome pluća, koji čine oko 15% svih karcinoma pluća, i ne-sitnostanične karcinome pluća koji čine oko 85% karcinoma pluća i dalje se dijele u podgrupe [10].

Sitnostanični karcinom pluća je maligni tumor patohistološki karakteriziran malim stanicama i oskudnom citoplazmom. Same granice stanica su slabo definirane, sadrže granulirani kromatin i odsutan ili neprimjetan nukleol. Mitotska aktivnost često je visoka, te se nerijetko vide područja nekroze. Ti tumori većinom su pozitivni na markere neuroendokrine diferencijacije kao što je kromogranin ili NCAM (CD56) [11].

Ovaj tip karcinoma izrazito je agresivan i povezan sa lošom prognozom. Ovisno o stadiju tumora petogodišnje preživljenje iznosi od 6%-27% [12].

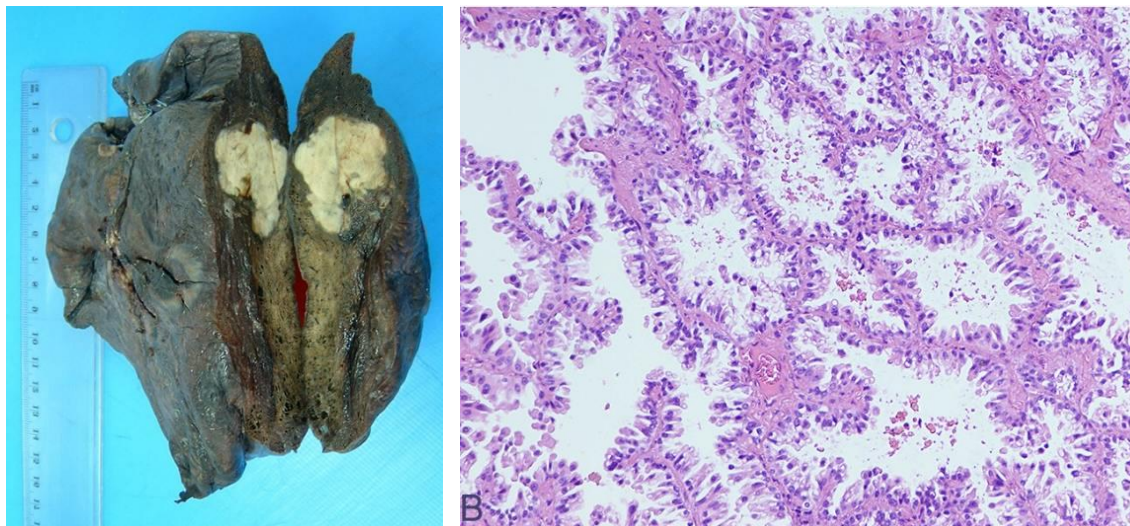
Ne-sitnostanični karcinomi pluća najučestaliji su karcinomi pluća. U ovu skupinu ubrajamo adenokarcinom kao najčešći oblik karcinoma pluća, planocelularni karcinom pluća, velikostanični karcinom pluća i ostale, rijeđe podtipove [13].

Tip karcinoma određuje se nakon patohistološkog pregleda preparata, odnosno imunohistokemijske dijagnostike. Kod adenokarcinoma bojanih hemalaun-eozinom (HE) može se vidjeti stvaranje žljezdanih formacija u obliku acinusa, papila i sl. Za njih je tipičan i leptični način rasta – tumorske stanice oblažu alveole i na taj se način šire (Slika 1).

Mikroskopske karakteristike planocelularnog karcinoma su stvaranje roževine, intracitoplazmatski keratin te prisutnost intercelularnih mostića [3].

Unatoč specifičnim mikrosopskim obilježjima, u oko 30-40% slučajeva adenokarcinom nije moguće razlikovati od planocelularnih karcinoma bez korištenja dodatnih imunohistokemijskih metoda. Uzrok je najčešće maleni uzorak ili slaba diferencijacija tumora [14].

Markeri koji se koriste u diferencijaciji ova dva tipa NSSKP su TTF1 (tireoidni transkripcijski faktor) i mucin za adenokarcinome, te p63/p40 koji su pozitivni kod planocelularnih karcinoma. Rijetki tumori, pozitivni na sva četiri markera, mogu predstavljati adenoskvamozne karcinome ili periferne adenokarcinome sa planocelularnom diferencijacijom. Manje od 10% tumora je TTF1, mucin, p63 i p40 negativno te se kvalificiraju kao nespecificirani NSSKP [14].



**Slika 1:** U perifernom dijelu plućnog režnja vidi se slabo ograničeni bjelkast čvor promjera oko 4 cm koji odgovara karcinomu pluća (A). Plućno tkivo nadomješteno je tumorom koji raste u obliku atipičnih žljezdanih formacija (B). U cijelosti preuzeto iz: Maja Krašević i sur. Atlas patologije. Medicinski Fakultet Sveučilišta u Rijeci

### 1.1.5. MOLEKULARNI PROFIL TUMORA PLUĆA

Već prilikom određivanja histološkog tipa tumora određuje se daljnji tijek imunohistokemijskih i molekularnih analiza s ciljem određivanja prognostičkih i prediktivnih biljega. Bitno je odrediti postoji li mutacija u nekom od onkogeno odnosno tumorskih supresorskih gena. Ovaj proces značajan je, jer utječe na terapiju bolesnika, a time i na ishod same bolesti. Mutacije onkogeno često su zaslužne za inicijaciju nastanka tumora kao i za njegovu proliferaciju. Onkogeni su najčešće geni koji kodiraju proteine signalnih puteva zadužene za održavanje normalne stanične proliferacije i preživljavanja te njihovom mutacijom dolazi do selekcije tumorskih stanica i progresije tumora [15].

Onkogeni koji se redovito određuju su epidermalni čimbenik rasta (EGFR) i anaplastična limfomska kinaza (ALK). EGFR receptor pripada obitelji tirozin kinaznih receptora. Nakon vezivanja liganda dolazi do strukturalne promijene receptora i aktivacije nekoga od signalnih puteva. Ovisno o tome koji će se put aktivirati, doći će do proliferacije stanica ili održavanja njihovog broja inhibicijom apoptoze [16].

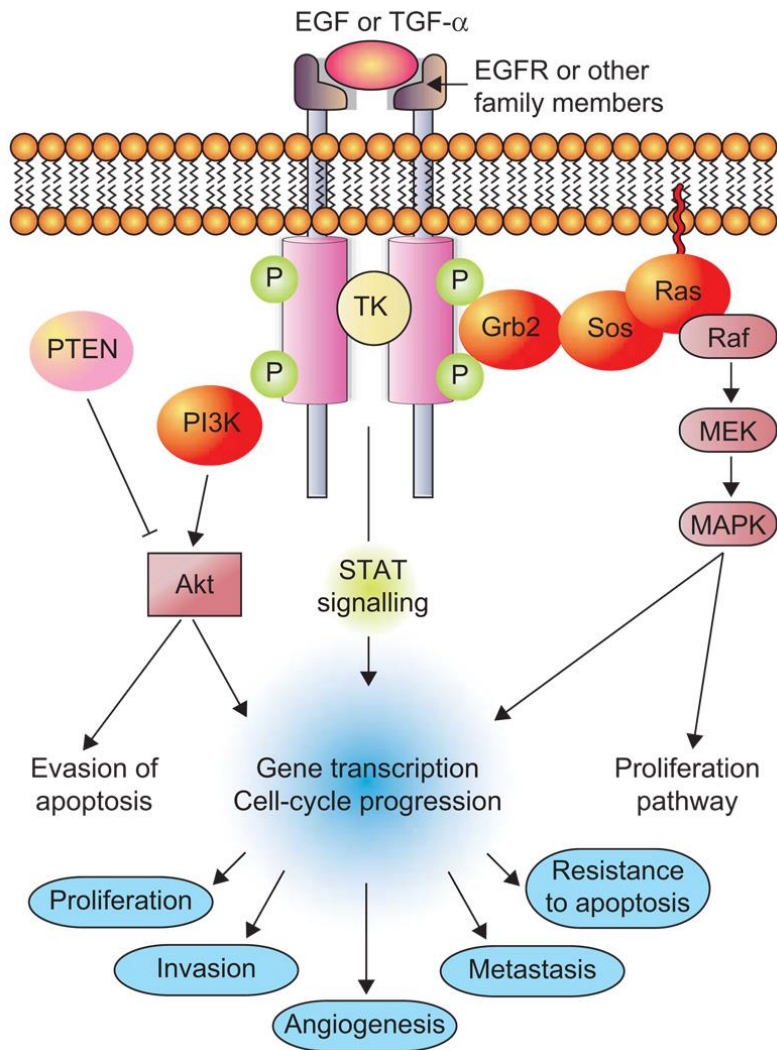
Prevalencija EGFR mutacije u NSSKP iznosi 32.2%, pri čemu je najčešće prisutna kod osoba koje boluju od adenokarcinoma. Češća je također kod žena, nepušača i osoba azijskog podrijetla [17].

Tirozin kinaznim inhibitorima zaustavlja se aktivacija EGFR signalnoga puta i na taj način sprijačava ili usporava progresija karcinoma, zbog čega je bitno kod svakog NSSKP odrediti status ovoga receptora. On se određuje real time PCR-om, kojim analiziramo prisustvo mutacija 18,19,20 i 21 egzona EGFR gena [16].

Anaplastična limfomska kinaza (anaplastic lymphoma kinase (*ALK*)) translocirana je u otprilike 4% NSSKP [18].

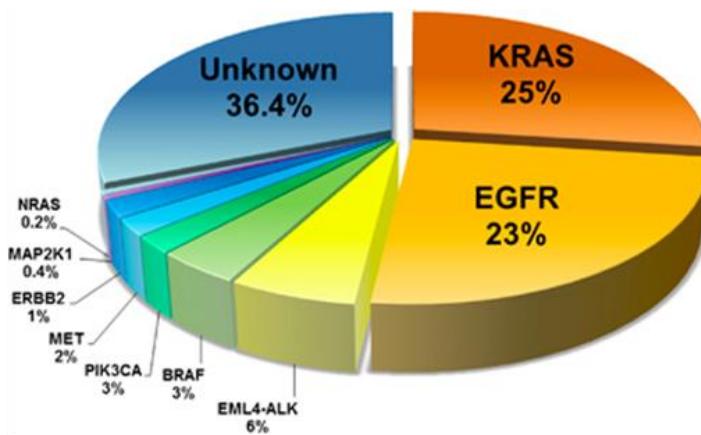
To je receptorska tirozin kinaza koja pripada inzulinskoj superobitelji. Mutacija je translokacijskog tipa te rezultira fuzijom *ALK* i *EML 4* gena što dovodi do opetovane aktivacije fuzijskih proteina i signalnih puteva koji dovode do proliferacije tumora. Translokacija se može direktno detektirati određivanjem sekvence fuzijskog gena ili FISH analizom ili indirektno IH analizom proteinskog produkta fuzijskog gena [15].

Nadalje, u 8-24% NSSKP prisutna je *KRAS* mutacija. *KRAS* pripada u skupinu enzima, GTP-aza, a kod mutacije prikazuje nepravilnu aktivnost i potiče aktivaciju RAS sustava. Pošto se *KRAS* nalazi niže u aktivacijskoj kaskadi od EGFR-a, njegova mutacija nam može objasniti rezistenciju na terapiju inhibitorima tirozin kinaze, te se stoga u nekim dijagnostičkim algoritmima i određuje status *KRAS*-a [15].



**Slika 2:** Signalni put receptora epidermalnog faktora rasta (engl. epidermal growth factor receptor, EGFR) . Ligandi, kao što su epidermani faktor rasta (engl.epidermal growth factor, EGF), transformirajući faktor rasta (engl. transforming growth factor, TGF)- $\alpha$ , i drugi, vežu se za homo- i heterodimernu kinaznu domenu (TK), što rezultira aktivacijom i transfosforilacijom. To otvara mjesto vezivanja za adaptorske proteine, Grb2 i Sos, koji aktiviraju Ras ifosfatidilinositol 3-kinazu (PI3K), dovodeći do formiranja dva glavna signalna puta, Ras/MAPK and PI3K/Akt. Aktivacija ovih puteva dovodi, među ostalim, do proliferacije, izbjegavanja apoptoze i angiogeneze. U cjelosti preuzeto iz: Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. Eur Respir J. 2009;33(6):1485–1497. doi:10.1183/09031936.00014009

Prema dijagnostičkom algoritmu kod svih tipova NSSKP određuje se PD-L1 status te postojanje EGFR i ALK mutacije. U sklopu patohistološke dijagnostike tumora imunohistokemijskom metodom određuje se i Ki-67 proliferacijski indeks. Ki-67 je nuklearni protein, prisutan u stanicama jedino tokom diobe, a njegova zastupljenost u stanicama tumora proporcionalna je tumorskoj aktivnosti odnosno proliferaciji. Postotak Ki-67 pozitivnih stanica označava se kao Ki-67 proliferacijski indeks te se koristi kao prognostični marker. Visok indeks govori u prilog visokoj proliferaciji odnosno agresivnosti tumora i smatra se lošim prognostičkim čimbenikom [19].



*NCI's Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC). J Clin Oncol 2011*

**Slika 3:** Prevalencija pojedinih mutacija u NSSKP. U cijelosti preuzeto iz: NCI's Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC). J Clin Oncol 2011 DOI:10.1200/jco.2011.29.18\_suppl.cra7506



### 1.1.5. ODREĐIVANJE STADIJA I STANDARDNO LIJEČENJE TUMORA PLUĆA

Nakon postavljena dijagnoze tumora pluća idući korak je određivanje stadija bolesti. Stadij bolesti se određuje kako bi se mogla odabrati prikladna terapija za bolesnika, a također je bitan za izračunavanje mogućnosti preživljenja, odnosno ima bitnu prognostičku vrijednost za samog bolesnika.

Stadij se određuje na temelju TNM klasifikacije, pri čemu se za tumore pluća koristi osmo izdanje smjernica od strane AJCC (engl. American Joint Committee on Cancer).

Za procjenu stadija u obzir se uzima veličina primarnog tumora, što je označeno slovom T u akronimu TNM, a dodaju mu se brojevi od 1-4 ovisno o njegovoj veličini. Nadalje, bitan je status limfnih čvorova označen slovom N. Negativni limfni čvorovi označavaju se kao N0, a ukoliko su pozitivni, ovisno o njihovoj lokalizaciji i broju, označavaju se N1-N3. Posljednja relevantna stavka u određivanju TNM stadija je prisutnost udaljenih metastaza. Njihov izostanak označava se M0 a njihova prisutnost označava se kao M1.

Na temelju ovih parametara tumori se svrstavaju u 4 glavne skupine (I-IV), pri čemu više skupine imaju lošiju prognozu. Temeljem stadija, smjericama je određena prva linija terapije. U ranijim stadijima bolesti, kada ona nije proširena, jedina terapija može biti operativni zahvat dok se u kasnijim stadijima uključuje radio i kemoterapija. U završnim stadijima bolesti može se provoditi jedino palijativna terapija [20].

U posljednjih 15-ak godina, napretkom znanosti i otkrićem tirozin kinaznih inhibitora, oni postaju značajna stavka u planiranju terapije kod pacijenta kod kojih je prisutna EGFR mutacija. Koriste se inhibitori prve generacije: erlotinib i gefitinib te trenutno lijek druge generacije afatinib. [21] Kod pacijenata čiji je tumor pozitivan na ALK mutaciju, kao lijek izbora spominje se krizotinib i drugi ALK inhibitori [22].

Treatment Recommendations and Future Research Directions for Non-Small Cell Lung Cancer			
Stage	Standard Management	Future Directions	Survival
IA and B	Surgical resection	Adjuvant therapy (chemotherapy/radiation or combination); chemoprevention	75% (IA) 55% (IB)
IIA and B	Surgical resection	Same as stage I	50% (IIA) 40% (IIB)
IIIA	Chemoradiotherapy, surgical resection in selected patients	Neoadjuvant combined-modality therapy to downstage primary tumor	10-35%
IIIB	Chemoradiotherapy	Same as stage IIIA	5%
IV	Ciplatin-based chemotherapy, surgical resection if solitary metastatic lesion with resectable primary tumor	More efficacious single-agent and combination chemotherapy	<5%

**Tablica 1:** U tablici je prikazano standardno liječenje NSSKP ovisno o stadiju bolesti, te buduće mogućnosti liječenja. Također je prikazano prosječno preživljenje za svaku skupinu. U cijelosti preuzeto iz National Comprehensive Cancer Network.

## 1.2. TUMORSKI MIKROOKOLIŠ

### 1.2.1. ULOGA TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA

NSSKP mogu se podijeliti u više različitih podgrupa ovisno o specifičnim obilježjima tumorskih stanica. Nadalje, svaki karcinom pluća ima specifični molekularni profil, ovisno o vrsti i količini mutacija unutar gena, ali postoji još jedna bitna komponenta po kojoj se razlikuju tumori, a koja bitno utječe na razvoj i progresiju tumora, a to su karakteristike tumorskog mikrookoliša.

Tumorski mikrookoliš označava sve normalne stanice, molekule i krvne žile koje okružuju ili prehranjuju tumor. Tumor može promijeniti mikrookoliš, a mikrookoliš može utjecati na progresiju tumora (definicija prema NCI rječniku).

Mikrookoliš solidnih tumora je kompleksan, sastoji se od stanica koje čine stromalne i mikrovaskularne strukture, te sudjeluju u imunosnom odgovoru. Prema novim istraživanjima interakcija tumorskog mikrookoliša i samoga tumora snažno je povezana sa tumorskom progresijom, ali i odgovorom na terapiju [23].

Glavni dijelovi tumorskog mikrookoliša su vaskularne strukture, fibroblasti povezani s karcinomom (cancer-associated fibroblasts, CAF), ekstracelularni matriks (EM) te imunosne stanice [24].

Neoangiogeneza, odnosno stvaranje novih krvnih žila, jedno je od glavnih obilježja zloćudnih tumora. Na taj način tumoru postaju dostupnije hranjive tvari, što dovodi do jače progresije i invazije tumora. Nadalje tumori imaju bolju mogućnost metastaziranja.

No međutim, koncept da je neovaskularizacija najzaslužnija za brzu progresiju tumora zadnjih je godina upitan, pošto je nađen veliki broj tumora bez elemenata neovaskularizacije, koji koriste već postojeće krvne žile za rast i širenje. Dokazano je da ti tumori imaju čak i lošiju prognozu [24].

Stvaranje aberantnih krvnih žila, fluktacije u protoku krvi i povećana potreba tumorskog tkiva za kisikom mogu uzrokovati stanje hipoksije. To stanje nadalje može uzrokovati odvajanje metastaza te može uvjetovati i lošiji odgovor na terapiju [23].

Uloga CAF stanica u NSSKP je izrazito široka. Oni često uzrokuju dezmodoplastičnu reakciju, a mogu utjecati na proliferaciju tumorskih stanica, angiogenezu, invaziju, stvaranje metastaza kao i na otpornost na terapiju. Odgovorni su nadalje i za modulaciju imunskog odgovora, naime neke CAF stanice mogu eksprimirati PDL-1 (engl. programmed cell death protein 1 ligand) molekulu koja spajanjem sa PD-1 receptorom uzrokuje supresiju T limfocita [24].

Ekstracelularni matriks sastavljen je od kolagena, proteoglikana i glikozaminoglikana i čini veliki udio u tumorskom mikrookolišu. Njegova interakcija sa tumorskim i stromalnim stanicama može dovesti do promocije kancerogeneze. Određene studije, rađene poglavito na mišjim modelima, dokazale su da ekspresija određenih receptora na komponentama EM može dovesti do aktivacije EGFR signalnoga puta kao i drugih signalnih puteva i dovesti do ekspanzije i širenja tumora. Nadalje, gustoća ekstracelularnoga matriksa može djelovati i kao barijera T limfocitima i ostalim imunskim stanicama i na taj način djelovati imunosupresivno [24].

### 1.2.2. ZNAČAJ STANICA IMUNOLOŠKOGA SUSTAVA U TUMORSKOM MIKROOKOLIŠU

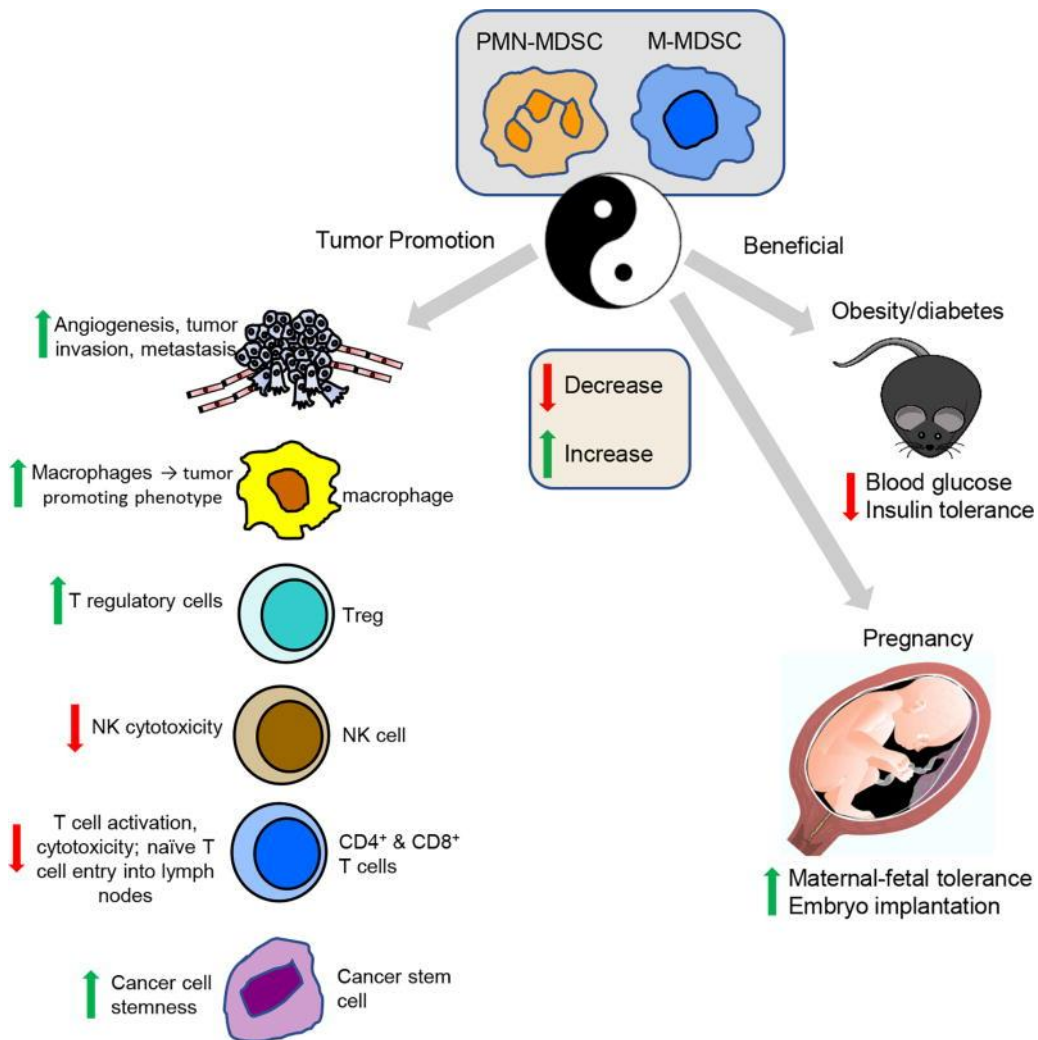
Stanice imunološkoga sustava jedna su od glavnih sastavnica tumorskog mikrookoliša, a njihovo međudjelovanje sa tumorskim stanicama može višestruko utjecati na progresiju tumora. Dendritičke stanice dio su urođenog imuniteta i njihova je glavna zadaća prezentacija antigena limfocitima. One su zaslužne za prezentaciju tumorskih antigena T limfocitima i aktivaciju imunološkog odgovora u tumorskom tkivu, međutim, postoje određeni načini na koji se njihova aktivacija može izbjeći [24].

U NSSKP dendritičke stanice mogu povećati ekspresiju B7-H3 molekule koje djeluje kao koreceptor i uzrokuje inaktivaciju T limfocita [25].

One također mogu proizvoditi TGF $\beta$  koji djeluje na diferencijaciju CD4+ T limfocita u CD4+CD25+ T limfocite, takozvane regulatorne T stanice koje suprimiraju imunosni odgovor.

[24] U više vrsta tumora pronađene su supresijske stanice mijeloidnog podrijetla (engl. myeloid derived supresor cells; MDSC) koje se mogu podjeliti u polimorfonuklearne MDSC (PM-MDSC) i monocitne MDSC (M-MDSC) [24].

To su nezrele imunosne stanice koje pripadaju mijeloidnoj lozi te je njihova glavna uloga promocija tumorskog rasta kroz imunosupresiju i ne imunosupresivne mehanizme. Lučenjem VEGF-a ove stanice potiču neoangiogenezu, dok korištenjem Arg1 i ROS molekula preveniraju aktivaciju T stanica i njihovu funkciju [26]. Na slici 4 sažeto su prikazani ostali mehanizmi djelovanja MDSC stanica.



**Slika 4:** MDSC stanice koriste se različitim imunskim i ne imunskim mehanizmima kako bi promovirali progresiju tumora, no u drugačijem okruženju imaju i korisne efekte. MDSC stanice inhibiraju antitumorsku aktivnost suprimirajući aktivaciju  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T stanica te regrutirajući T regulatorne stanice. Nadalje potiču polarizaciju makrofaga u M2 (tumor promovirajući) tip i inhibiraju toksičnost uzrokovanu NK stanicama. MDSC stanice također facilitiraju angiogenezu i potiču invaziju tumora i metastaziranje. Pozitivni efekti MDSC stanica uključuju snižavanje glukoze u krvi i smanjenje inzulinske tolerancije u pretilih osoba. Također sudjeluju u održavanju fetomaternalne tolerancije tokom trudnoće. U cijelosti preuzeto iz: Ostrand-Rosenberg S, Fenselau C. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Immune-Suppressive Cells That Impair Antitumor Immunity and Are Sculpted by Their Environment. *J Immunol.* 2018;200(2):422–431. doi:10.4049/jimmunol.1701019

Makrofazi povezani s tumorom (engl. Tumor-associated macrophages; TAM) dijele se u dvije kategorije. Prva kategorija su M1 makrofazi, to su klasični, proinflamatorni makrofazi, koji pokazuju antitumorsko djelovanje. Druga kategorija makrofaga su makrofazi M2, oni se alternativno aktiviraju pod djelovanjem lokalnog mikrokoliša i djeluju protumorski, odnosno potiču angiogenezu i djeluju imunosupresivno [24].

T limfociti, poglavito CD4+ i CD8+, su izrazito bitan faktor u borbi protiv tumora. Oni su odgovorni za završne citotoksične funkcije kao i posredovanje u imunološkome odgovoru, međutim, tumori su razvili različite načine inaktivacije tih stanica čime se postiže imunosuprsija i progresija tumora [24].

### 1.2.3. FUNKCIJA PD-1 I PD-L1 MOLEKULA U TUMORSKOM MIKROOKOLIŠU

PD-1 (engl. Programmed death-1) je transmembranski protein tipa 1 koji pripada CD28/CTLA-4 imunoglobulinskoj obitelji. On je jedan od najznačajnijih inhibitornih koreceptora koji su eksprimirani na T limfocitima. Osim T limfocita mogu ga eksprimirati i B limfociti, monociti, dendritičke stanice, NK stanice i limfociti koji infiltriraju tumore (TILs, engl. Tumor-infiltrating lymphocytes) [27].

PD-1 molekula ima dva poznata liganda: PD-L1 (engl. Programmed death - ligand 1; B7-H1; CD274) i PD-L2 (engl. Programmed death – ligand 2; B7-DC;CD273). PD-L2 ekspresija prisutna je na makrofazima i dendritičkim stanicama te se vjeruje da je njegova glavna uloga u regulaciji i polarizaciji T limfocita, dok se PD-L1 nalazi na većem broju stanica i vjeruje se da ima veću ulogu u regulaciji imunološkog sustava. Naime, njegova ekspresija dokazana je na T i B limfocitima, dendritičkim stanicama, makrofazima, endotelnim i epitelnim stanicama, te se vjeruje da on ima ulogu zaštite perifernog tkiva od ekcesivne upale. Značajno je napomenuti

da je PD-L1 ekspresija vidljiva i u različitim vrstama tumora [27].

Ekspresija PD-L1 molekule je inducirana različitim proupalnim molekulama, uključujući IFN -  $\gamma$ , TNF -  $\alpha$ , LPS, VEGF te interleukine IL-10 i IL-4. Prilikom vezivanja s ligandom, PD-1 molekulom, dolazi do supresije imunskog odgovora na više načina. Dolazi do inhibicije proliferacije i aktivacije, te do apoptoze CD8+ citotoksičnih T limfocita, a u isto vrijeme potiče se diferencijacija T regulatornih limfocita. To dovodi do stanja smanjene upale u perifernim tkivima što je izrazito bitno u stanjima prekomjerne upale, međutim, ukoliko dođe do vezivanja PD-1 molekule na PD -L1 eksprimiran u tumoru, dolazi do inhibicije imunodne reakcije protiv tumora. To nadalje može dovesti do proliferacije tumorskih stanica i progresije samog tumora [28].

#### 1.2.4. EKSPRESIJA PD-1 I PD-L1 U TUMORSKOM TKIVU I KLINIČKI ZNAČAJ

PD-1/PD-L1 signalni put ima bitnu ulogu u regulaciji imunskog sustava u različitim stanjima. Jedna od njegovih uloga je održavanje kronične virusne infekcije. Naime, dok u akutnoj virusnoj infekciji dolazi do aktivacije efektivnih CD8+ T limfocita koji eliminiraju virus i nakon toga prelaze u apoptozu ili u T memorijske stanice, prilikom kronične virusne infekcije prisutan je drugačiji slijed događaja. Dolazi do aktivacije PD-1/PD-L1 signalnog puta te supresije efektivnih CD8+ T limfocita, i nemogućnosti eliminacije virusa što podržava oblik kronične upale. [29] Moguće je da ovaj signalni put ima ulogu i u razvoju određenih autoimunih bolesti, poglavito šećerne bolesti tipa 1 i sistemnog eritematoznog lupusa. PD-L1 ekspresija vidljiva je na beta stanicama pankreasa te se vjeruje da je uključena u zaštitu tih stanica od T-limfocita, naime tretman ne pretilih miševa s PD-1/PD-L1 blokatorima uzrokovao je brži razvoj šećerne bolesti tip 1 što govori u prilog ovoj teoriji [29].



PD-L1 ekspresiju pokazuju različite vrste tumorskih stanica poglavito NSSKP, melanom, karcinom bubrega te različite vrste leukemija i multipli mijelom. Sama ekspresija je inducirana različitim proinflamatornim molekulama koje proizvode stanice tumorskog mikrookoliša, pri čemu najznačajniju ulogu ima INF- $\gamma$ . Nakon vezivanja liganda na PD-1 receptor dolazi do aktivacije prije navedenih mehanizama koji dovode do supresije imunskog odgovora koji pogoduje proliferaciji tumora [27].

Mnoga retrospektivna istraživanja pokazala su kako je prekomjerna PD-L1 ekspresija povezana sa lošijom prognozom i visokim stupnjem invazivnosti u pacijenata sa NSSKP [30]. Nadalje, povišena PD-L1 ekspresija povezana je sa višim histološkim gradusom odnosno lošije diferenciranim NSSKP [31].

U pojedinim istraživanjima pokazalo se da PD-L1 ekspresija recipročno korelira s brojem TIL-a (engl. Tumor infiltrating lymphocytes) u karcinomu pluća što može dovesti do smanjenog imunološkog odgovora i dovesti do propagacije tumora [32].

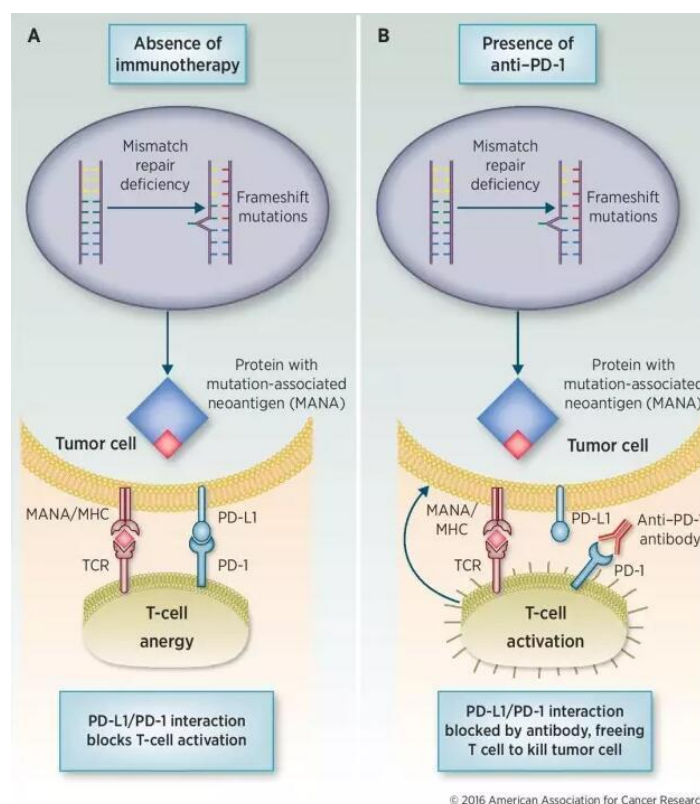
Povećana ekspresija PD-1 molekula također je dovedena u korelaciju s rastom tumora [33].

Studije pokazuju kako je PD-L1 i PD-1 ekspresija na tumorskim stanicama odnosno TIL-u NSSKP povezana s efikasnosti imunoterapije, a razvojem inhibitora PD-1/PD-L1 signalnoga puta bitno je procijeniti koji će kandidati povoljno reagirati na terapiju radi čega je potrebno daljnje istraživanje ovih dviju molekula i njihove povezanosti s tumorskom progresijom [27].

Inhibicija PD-1/PD-L1 signalnog puta inhibitornim lijekovima može omesti interakciju između PD-1 molekule i njenih liganda i na taj način spriječiti inaktivaciju T limfocita. Aktivni citotoksični T limfociti bi onda bili u mogućnosti prepoznati tumorsku stanicu i potencijalno je uništiti. Razvoj PD-1 inhibitora kao što su nivolumab i pembrolizumab, te PD-L1 inhibitora MPDL3280A predstavljaju pravo otkriće i napredak u tretmanu više vrsta tumora, među

kojima i NSSKP. [34]Ti lijekovi su po strukturi humana Ig4 monoklona protutijela, a prvi odobreni lijek bio je pembrolizumab 2014. godine za liječenje uznapredovalog melanoma. 2015. godine nivolumab i atezolizumab odobreni su za korištenje kod pacijenata s metastatskim NSSKP, a godinu nakon PD-L1 protutijelo, Atezolizumab, odobreno je za istu indikaciju. Durvalumab i Avelumab kao PD-L1 inhibitori u naprednoj su fazi kliničkih istraživanja i pokazuju dobre rezultate [35, 36].

PD-L1 i PD-1 ekspresija na tumorskim stanicama odnosno TIL-u NSSKP povezana je s efikasnosti imunoterapije, a razvojem inhibitora PD-1/PD-L1 signalnoga puta bitno je procijeniti koji će kandidati povoljno reagirati na terapiju radi čega je potrebno daljnje istraživanje ovih dviju molekula i njihove povezanosti sa tumorskom progresijom [27].



**Slika 5:** Slika prikazuje normalnu interakciju PD-1 i PD-L1 molekule u tumorskom tkivu pri čemu dolazi do anergije T limfocita (A). Korištenjem PD-1 inhibitora dolazi do inhibicije PD-1/PD-L1 signalnoga puta i aktivacije T limfocita u tumorskom tkivu (B). U potpunosti preuzeto sa: <https://www.fn-test.com/news/product-news/pd-1pd-l1-interaction-blocked-antibodies-freeing-t-cell-kill-tumor-cell/>

Agent	Mechanism of action	Trial name(s)	FDA-approved PD-L1 companion diagnostic
Pembrolizumab	PD-1 inhibitor	KEYNOTE	Primary antibody: 22C3 (Dako) IHC scoring: Tumor cell membrane Therapeutic developer: Merck
Nivolumab	PD-1 inhibitor	CheckMate	Primary antibody: 28-8 (Dako) IHC scoring: Tumor cell membrane Therapeutic developer: BMS
Atezolizumab	PD-L1 inhibitor	IMVigor (UC), POPLAR (NSCLC), OAK (NSCLC)	Primary antibody: SP142 (Ventana) IHC scoring: Tumor cell membrane, infiltrating immune cells Therapeutic developer: Genentech
Durvalumab	PD-L1 inhibitor	Study 1108	Primary antibody: SP263 (Ventana) IHC scoring: Tumor cell membrane Therapeutic developer: AstraZeneca
Avelumab	PD-L1 inhibitor	JAVELIN	Primary antibody: 73-10 (Dako) <sup>a</sup> IHC scoring: Tumor cell membrane Therapeutic developer: Merck, Pfizer

*PD-1* programmed cell death 1, *PD-L1* programmed death ligand 1, *FDA* Food and Drug Administration, *IHC* immunohistochemistry, *BMS* Bristol-Myers Squibb, *UC* urothelial carcinoma, *NSCLC* non-small cell lung cancer

<sup>a</sup> For research use only

**Slika 6.** Pregled PD-1/PD-L1 inhibitora, mehanizma rada, oznake studije i odobrene dijagnostike.[35]

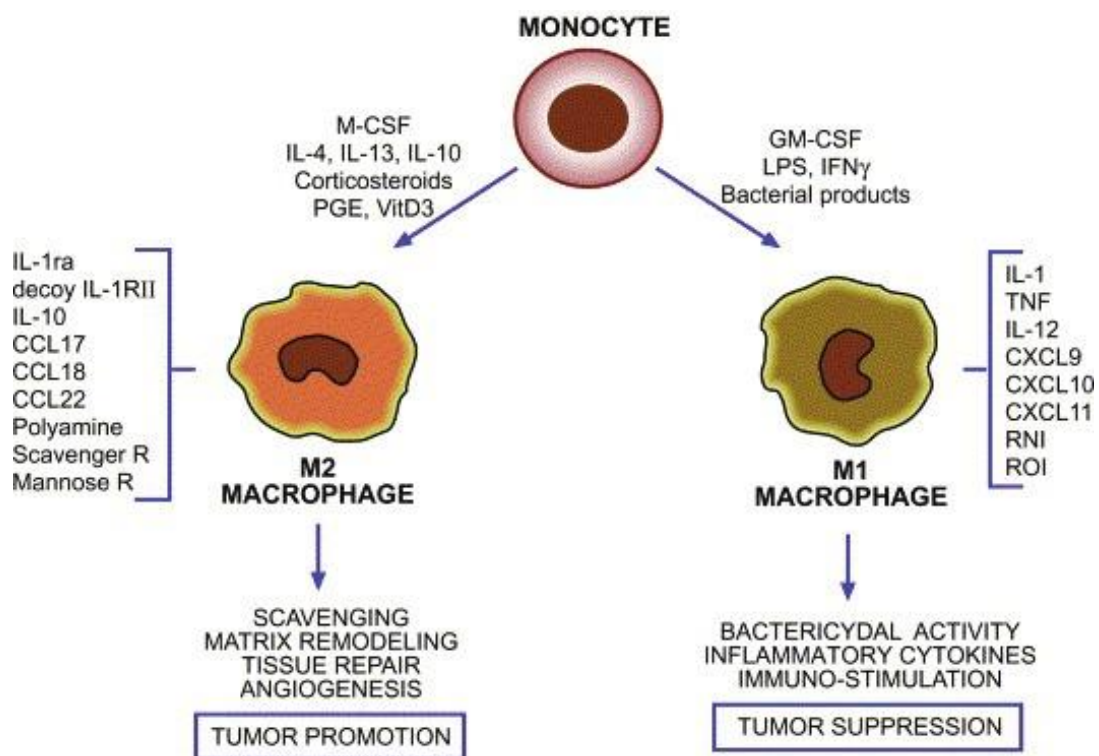
### 1.2.5. M1 I M2 MAKROFAZI I NJIHOVA FUNKCIJA

Makrofazi predstavljaju heterogenu populaciju stanica urođenog imunskog sustava.

Razvijaju se od monocitnog prekursora pod utjecajem različitih signala koje dobivaju od okolnoga tkiva. Imaju vrlo široku ulogu u imunskom sustavu. Djeluju kao antigen prezentirajuće stanice (APC) koje eksprimiraju MHC molekule klase I i II kao i koinhibitorne odnosno kostimulatorne molekule za regulaciju T limfocita [37].

Nadalje pokazuju mogućnost fagocitoze i druge načine obrane od stranih antigena, međutim, također imaju ulogu u cijeljenju rana, razvoju tkiva i regulaciji imunskog sustava. Pokazuju visoki stupanj plasticiteta kao odgovor na dobivene signale te je njihova diferencijacija izrazito složena i mogu zauzeti više različitih oblika. Radi pojednostavljanja najčešće se opisuju dva krajnja oblika makrofaga: M1 i M2 makrofazi [38].

Klasično-aktivirani, M1, makrofazi polariziraju se pod utjecajem bakterijskih molekula kao što je lipopolisaharid (LPS), Th1 citokina  $IFN\gamma$  ili radi aktivacije Toll-like receptora (TLR). Nakon aktivacije M1 makrofazi mogu fagocitirati i uništiti mikrobe, eliminirati tumorske stanice, prezentirati antigene T limfocitima i na taj način ih aktivirati, a otpuštaju i razne proupalne citokine. Najvažniji citokini koje otpuštaju su IL-12, iNOS (engl. inducible nitric oxide synthase) i ROS (engl. Reactive oxygen species). Na sve ove načine M1 makrofazi podržavaju upalno stanje. [38] Izloženost Th2 i tumorskim citokinima kao što su IL-4, IL-10, IL-13,  $TGF\beta$  (engl. Tumor growth factor  $\beta$ ) ili prostaglandinu E2 (PGE2) potiče polarizaciju makrofaga u alternativno aktivirane, M2, makrofage. Oni potiču Th2 imunski odgovor a suprimiraju Th1 imunski odgovor proizvodnjom IL-10 i IL-1B citokina, također ppromoviraju pregradnju tkiva i cijeljenje rana te potiču neoangiogenezu. Uzimajući u obzir sve funkcije M2 makrofaga vidljivo je kako oni mogu poticati tumorski rast [38].



**Slika 7:** Putevi diferencijacije klasično –aktiviranih M1 makrofaga i alternativno aktiviranih M2 makrofaga [38].

### 1.2.6. EKSPRESIJA M1 I M2 MAKROFAGA U TUMORSKOM TKIVU I KLINIČKI ZNAČAJ

Već dugo vremena poznato je kako makrofazi igraju bitnu ulogu u razvoju i proliferaciji tumora što je dokazano na nekim mišjim modelima. U zadnje vrijeme uloga makrofaga je dokazana i na modelima ljudskih tumora, među ostalim NSSKP, u kojima se makrofazi imunohistokemijski označavaju protutijelom protiv CD68 molekule. Različite studije dokazale se kako je veći broj TAM-a (engl. Tumor associated macrophages) povezan s lošijom prognozom odnosno kraćim preživljenjem. Međutim, neke studije pokazale su kako ta korelacija ne postoji, a otkrićem M1 i M2 makrofaga nameće se pitanje koja je njihova uloga i kako njihov omjer utječe na razvoj tumora [37].

Ohri i sur. prvi su u svojoj studiji dokazali prisutnost M1 i M2 makrofaga u NSSKP i povezali je s preživljenjem. U njihovoj studiji, koja je rađena na uzorcima tkiva NSSKP operiranih pacijenata, M1 makrofazi su imunohistokemijski označeni antitijelima za HLA-DR, iNOS, TNF $\alpha$  i MRP 8/14 dok su M2 makrofazi označeni CD163 i VEGF antitijelima. Dokazana je povezanost većeg broja makrofaga i lošijeg preživljenja, no također je dokazano da je veći broj M1 makrofaga povezan s duljim preživljenjem [39].

Druge studije pokazuju povezanost gustoće M1 makrofaga u stromi s duljim preživljenjem, dok za gustoću M2 makrofaga nije dokazana povezanost s boljom prognozom [40].

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Sastav tumorskog mikrokoliša i njegov utjecaj na razvoj i progresiju tumora danas je jedna od glavnih tema istraživanja povezanih uz tumore. Vjeruje se da bi boljim razumijevanjem te interakcije moglo doći do razvoja uspješnijih lijekova i boljeg liječenja malignih bolesti. U ovom istraživanju glavni cilj je utvrditi ekspresiju PD-1 molekula na tumor infiltrirajućim limfocitima te istražiti povezanost iste s kliničko-patološkim karakteristikama tumora i preživljenjem. Nadalje, cilj nam je bio utvrditi prisutnost M1 makrofaga u tumorskom mikrokolišu te usporediti omjer M1 makrofaga i strome s istim kliničko-patološkim karakteristikama i preživljenjem bolesnika.

1. Procijeniti ekspresiju PD-1 u uzorku NSSKP-a.
2. Utvrditi povezanost PD-1 ekspresije sa histološkim tipom tumora.
3. Utvrditi povezanost PD-1 ekspresije s prognostičkim čimbenicima kao što su stupanj diferenciranosti tumora (gradus), veličina tumora, proliferacijski indeks tumora (Ki-67), invazija pleure te stadij proširenosti bolesti.
4. Ispitati utjecaj PD-1 ekspresije na duljinu preživljenja bolesnika od datuma postavljanja dijagnoze.
5. Dokazati prisutnost M1 makrofaga u NSSKP i procijeniti njihovu gustoću kao postotak obojenih stanica strome.
6. Istražiti povezanost prisutnosti M1 makrofaga i histološkog tipa tumora.
7. Istražiti povezanost prisutnosti M1 makrofaga s prognostičkim čimbenicima kao što su stupanj diferenciranosti tumora (gradus), veličina tumora, proliferacijski indeks tumora, invazija pleure te stadij proširenosti bolesti.
8. Ispitati povezanost prisutnosti M1 makrofagana duljinu 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 2015. godine zbog tumora pluća. Njihovo je tkivo standardnim postupkom fiksirano i uklopljeno u parafin na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. U istraživanje su uključeni svi pacijenti kod kojih su postojali potrebni patohistološki i klinički podatci te dovoljna količina očuvanog tumorskog tkiva.

Iz računalne baze podataka Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci očitani su svi potrebni patohistološki podaci, a klinički podaci su prikupljeni iz medicinske dokumentacije bolesnika 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.

U istraživanje su uključena 155 uzorka 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 i određena je 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 PROGNOŠTIČKIH FAKTORA

U istraživanju su analizirani i korišteni prognostički faktori koji se određuju već prilikom postavljanja patohistološke dijagnoze NSSKP. Za svaki uzorak određen je histološki podtip tumora te stadij diferencijacije tumora (gradus), korištenjem klasifikacije Svjetske zdravstvene organizacije . Nadalje, određen je patološki stadij tumora (pT), postojanje invazije pleure te širenje bolesti u regionalne limfne čvorove. Analizom veličine tumora i prisustva sekundarnih depozita u limfnim čvorovima, te pregledom odgovarajuće dokumentacije kako bi se dobio uvid u postojanje udaljenih metastaza, nadalje je određen stadij bolesti temeljem TNM klasifikacije. Analizom prikupljenih podataka dobilo se i preživljenje bolesnika od trenutka postavljanja dijagnoze.



### 3.2.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE

Parafinski rezovi debljine 3-4  $\mu\text{m}$  sušeni su preko noći na temperaturi od 55°C. Nakon toga su deparafinizirani i dehidrirani na uobičajeni način. Primarna protutijela koja su korištena u istraživanju prikazana su u Tablici 2.

**Tablica 2. Primarna protutijela protiv humanih epitopa korištena u imunohistokemijskom bojanju**

Protutijelo	porijeklo	klon, proizvođač	razrjeđenje i inkubacija	pretretman
Protiv PD-1	mišje monoklonalno IgG <sub>1</sub>	NAT105, Cell Marque, Rocklin, Kalifornija, SAD	1:50, 60 minuta, linker (Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornija, SAD)	PT-Link (Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornija, SAD) 20 min.
Protiv HLA-DR	mišje monoklonalno IgG <sub>1</sub>	TAL 1B5, Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornija, SAD	1:200, 30 minuta	PT-Link (Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornija, SAD) 20 min.
Protiv Ki-67	mišje monoklonalno IgG <sub>1</sub>	MIB-1, Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornija, SAD	1:50, 30 minuta	tris-EDTA pufer, pH 9 u vodenoj kupelji tijekom 10 min. na temperaturi od 95- 100 °C

Nakon pretretmana razotkrivanja antigena, rezovi su hlađeni 45 minuta na sobnoj temperaturi, inkubirani tokom 30 minuta s otopinom za blokiranje nespecifičnog vezivanja protutijela (Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornija, SAD) te je potom korištena EnVision imunohistokemijska metoda u automatskom imunobojaču (Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornija, SAD) prema uputama proizvođača. Kako bi se vizualizirala specifičnosti vezivanja primarnog protutijela korišten je ChemMate™ detection kit (K 5001 i K 5007, Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Kao negativna kontrola poslužio je rez na kojem se umjesto sekundarnog protutijela nalazio razrjeđivač protutijela ChemMate antibody diluent (S 2022, Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornija, SAD).

### 3.2.3. ODREĐIVANJE PROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI

Ki-67 protutijelo boji jezgre stanica u proliferaciji te se zbog toga koristi kao biljeg proliferativne aktivnosti tumorskih stanica. On se iskazuje kao indeks proliferacije koji označava postotak pozitivno obojanih jezgra s Ki-67 protutijelom korištenjem povećanja x400 svjetlosnog mikroskopa.

### 3.2.4. ODREĐIVANJE EKSPRESIJE PD-1 MOLEKULE

Ekspresija PD-1 molekule određena je svjetlosnim mikroskopom kao broj PD-1 pozitivnih stanica pod povećanjem x400. Uzorci su podijeljeni u 4 kategorije ovisno o broju PD-1 pozitivnih stanica: 0 (broj pozitivnih stanica <50), 1 (broj pozitivnih stanica 50-100), 2 (broj pozitivnih stanica (101-200) i 3 (broj pozitivnih stanica >200).

### 3.2.5. ODREĐIVANJE POSTOTKA M1 MAKROFAGA U TUMORSKOJ STROMI

Prisutnost M1 makrofaga određena je pod svjetlosnim mikroskopom na temelju morfoloških obilježja makrofaga i pozitivne obojenosti anti HLA-DR protutijelom. Rezultat je izražen kao postotak HLA-DR pozitivnih stanica strome u odnosu na ostatak strome.

### 3.2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Podatci su uneseni u proračunsku tablicu i obrađeni pomoću računalnog programa Statistica 12 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD) uz razinu statističke značajnosti od  $p < 0.05$ . Za testiranje razlike između kategoričkih varijabli korišten je  $\chi^2$  test. Postotak kumulativnog preživljavanja bolesnika za petogodišnje razdoblje za skupine NSSKP-a s različitim izražajem za PD-1 i HLA-DR određen je Kaplan-Meier-ovom metodom, a razlika između krivulja preživljavanja utvrđena je pomoću log-rank testa. Mann Whitney U-test i Kruskal-Wallis ANOVA je korišten za utvrđivanje razlike između kategoričkih i numeričkih varijabli.

## 4. REZULTATI

### 4.1. KLINIČKOPATOLOŠKA OBILJEŽJA SUDIONIKA

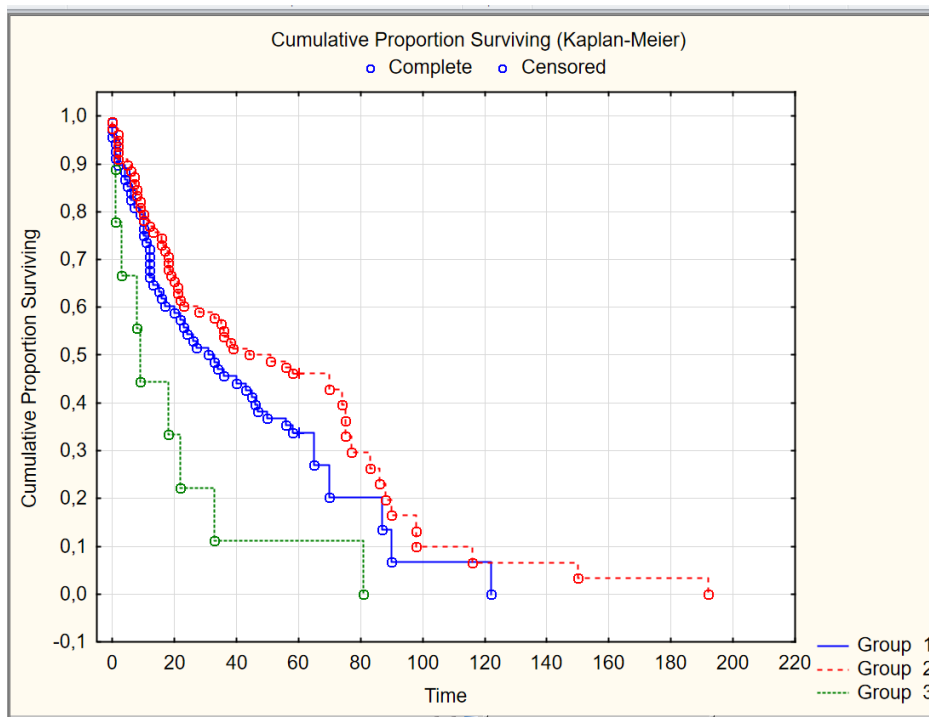
Prosječna dob ispitanika iznosila je 64 godine, a većinu su činili muškarci (69,7%). Adenokarcinom i planocelularni karcinom bili su gotovo jednako zastupljeni s time da je adenokarcinom ipak bio nešto učestaliji. Ostali histološki tipovi tumora bili su zastupljeni svega 7%. Najzastupljeniji histološki gradus bio je gradus 2 s udjelom 46,8%, dok je najčešći patološki stadij bio 2a. Kod čak 82,6% ispitanika tumor se prema TNM klasifikaciji klasificirao u prva dva stadija, dok je najučestaliji stadij bio stadij IIA. Pleura je bila zahvaćena u 24,2% ispitanika a prosječno preživljenje ispitanika iznosilo je 39 mjeseci. Podatci su prikazani u Tablici 3.

**Tablica 3: Kliničkopatološka obilježja ispitanika**

<b>Obilježje</b>	<b>N(%)</b>
<b>Prosječna dob ispitanika (god.)</b>	64
<b>Spol bolesnika</b>	
<b>Muški</b>	108 (69,7%)
<b>Ženski</b>	47 (30,3%)
<b>Histološki tip tumora</b>	
<b>Planocelularni</b>	77 (43,3%)
<b>Adenokarcinom</b>	67 (49,7%)
<b>Ostali</b>	11 (7%)
<b>Zahvaćenost pleure</b>	37 (24,2%)
<b>Prosječno preživljenje (mj)</b>	39
<b>Patološki stadij</b>	
<b>1a</b>	24 (15,9%)
<b>1b</b>	31 (20,5%)
<b>2a</b>	63 (41,7%)
<b>2b</b>	19 (12,6%)
<b>3</b>	12 (8,6%)
<b>4</b>	1 (0,7%)
<b>Stadij bolesti (TNM)</b>	
<b>IA</b>	31 (21,5%)
<b>IB</b>	38 (26,4%)
<b>IIA</b>	41 (28,5%)
<b>IIB</b>	9 (6,3%)
<b>IIIA</b>	10 (6,9%)
<b>IIIB</b>	0 (0%)
<b>IV</b>	15 (10,4%)

#### 4.2. POVEZANOST PD-1 EKSPRESIJE I KLINIČKOPATOLOŠKIH OBILJEŽJA

Ekspresija PD-1 molekule vidljiva je kao citoplazmatsko i membransko obojenje limfocita tumorske strome. Uočena je i na drugim stanicama intersticija, međutim znatno je slabije izražena. Na preko 40% uzoraka bilo je prisutno manje od 50 PD-1 pozitivnih stanica dok je na 30% uzoraka PD-1 ekspresiju pokazalo između 50-100 limfocita. Otprilike na jednoj trećini uzoraka pozitivno se obojalo više od 100 limfocita. Prilikom analize podataka uzeta je maksimalna vrijednost PD-1 koja je zatim uspoređena s kliničkopatološkim podacima. Statistička analiza podataka pokazala je povezanost između PD-1 ekspresije i histološkog gradusa tumora ( $p=0,050$ ) i to na način da je viši histološki gradus povezan s većim brojem PD-1 pozitivnih stanica u tumorskom mikrookolišu. Nadalje, PD-1 ekspresija povezana je sa višim patološkim stadijem tumora ( $p=0,004$ ) i kraćim preživljenjem ( $p=0,029$ , Slika 8).

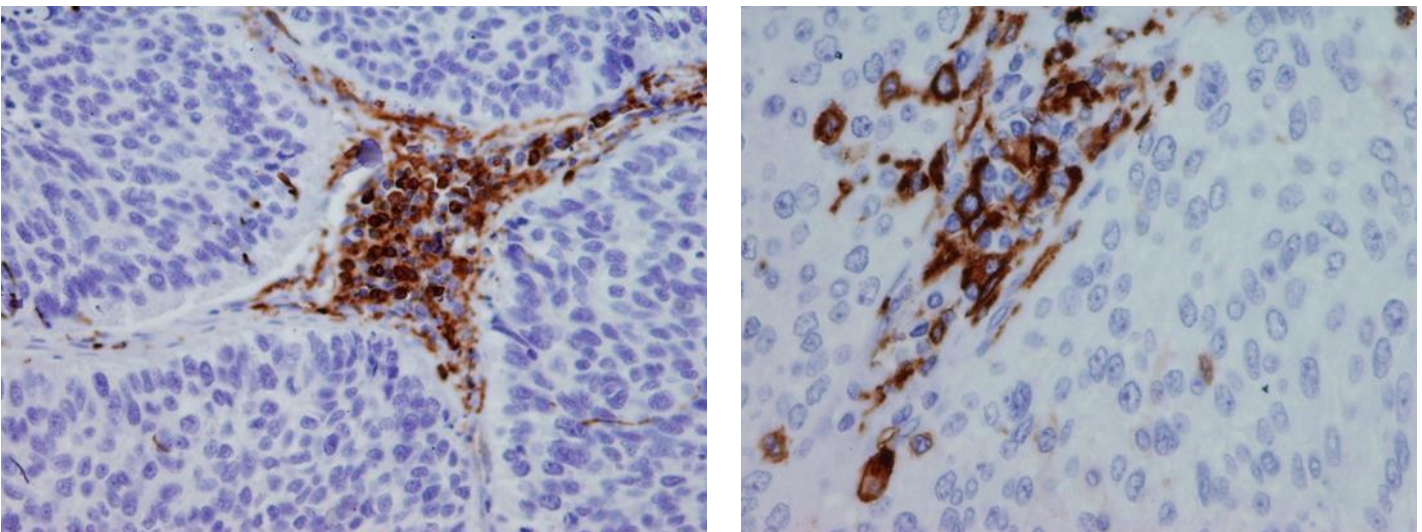


**Slika 8:** Kaplan-Meier graf pokazuje povezanost kraćeg preživljenja sa većim brojem PD-1 pozitivnih stanica. ( $p=0.029$ )

Obradom podataka nije dokazana povezanost PD-1 ekspresije s veličinom i proliferativnim indeksom tumora. Nema dokaza da je PD-1 ekspresija povezana s infiltracijom pleure i stadijem bolesti.

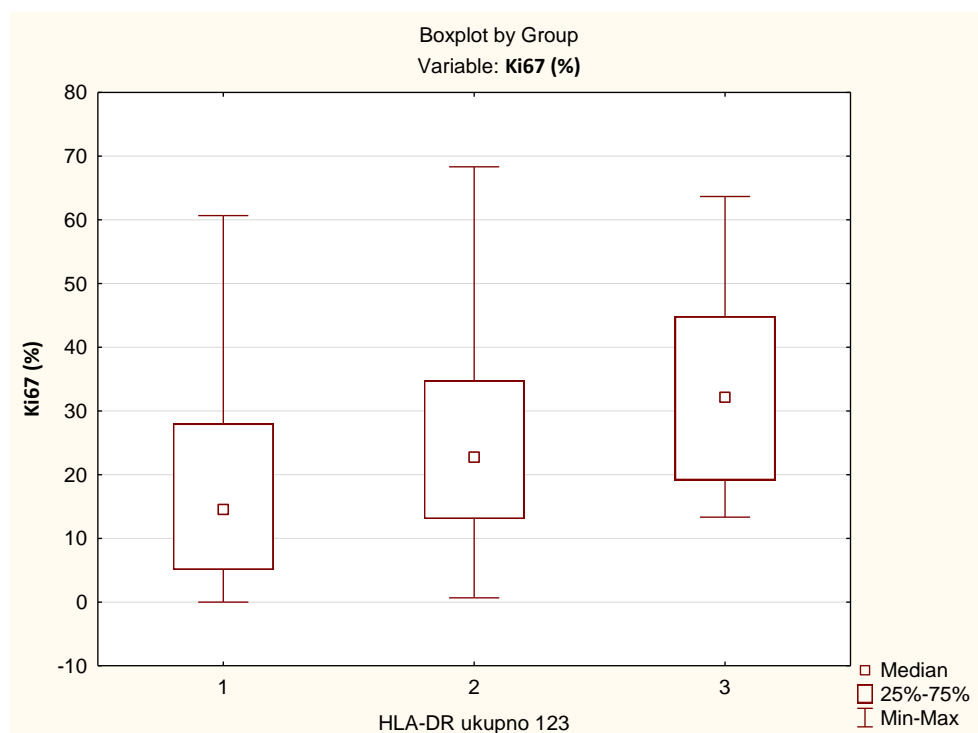
#### 4.3. POVEZANOST HLA-DR EKSPRESIJE I KLINIČKOPATOLOŠKIH OBILJEŽJA

HLA-DR ekspresija uočena je kao membransko obojenje na stanicama intersticija i tumorskim stanicama NSSKP. Dominantno su označeni makrofazi, koje smo identificirali na temelju morfoloških obilježja (Slika 9). Njihova prisutnost mjerena je kao postotak HLA-DR pozitivnih makrofaga u stromi u odnosu na ostatak strome, a za potrebe statističke analize uzeli smo prosječne vrijednosti HLA-DR sa svih uzoraka tumora te ih rasporedili u tri kategorije. U prvu kategoriju spadaju svi tumori čija je prosječna zastupljenost HLA-DR pozitivnih stanica u stromi manja ili jednaka 9%. U drugu kategoriju spadaju oni tumori sa zastupljenosti između 10-18%, dok se u trećoj nalaze tumori sa više od 18% HLA-DR pozitivnih stanica u stromi.



**Slika 9:** Prikaz HLA-DR pozitivnih makrofaga koji zauzimaju veći dio tumorske strome na x100 (A) i x400 (B) povećanju.

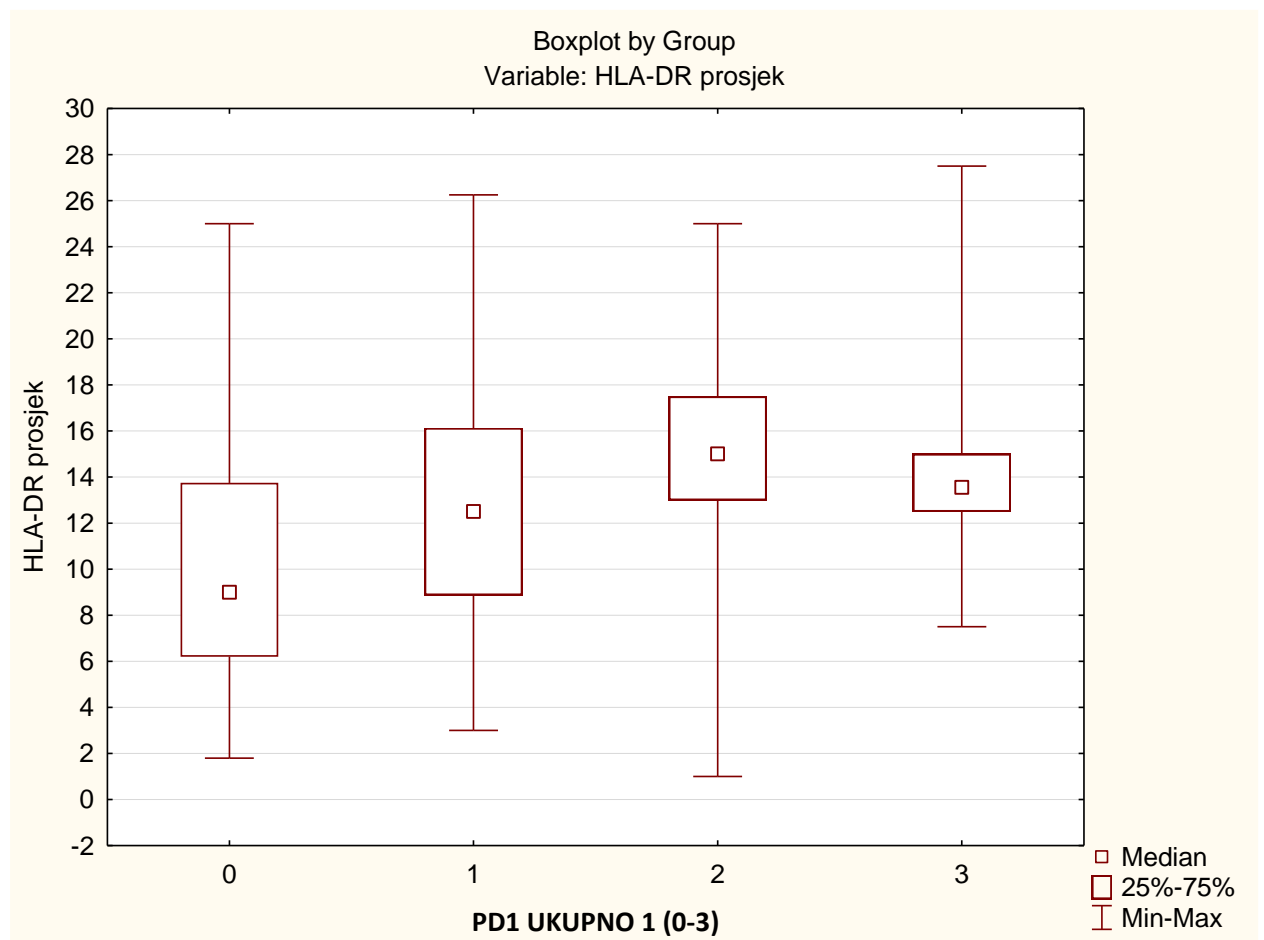
Preko 50% naših uzoraka spada u kategoriju 2, dok ih jedna trećina odnosno 50 uzoraka spada u prvu kategoriju, a njih 13% odnosno 20 uzoraka spada u treću kategoriju. Statističkom analizom utvrđena je povezanost između HLA-DR ekspresije i višeg patološkog stadija tumora ( $p=0.035$ ). Postotak HLA-DR pozitivnih stanica također pokazuje proporcionalnu povezanost sa Ki-67 indeksom (Slika 10). HLA-DR ne pokazuje povezanost sa tipom tumora, stadijem bolesti, histološkim gradusom, invazijom pleure kao ni s veličinom tumora.



**Slika 10:** Kruskal-Waliss ANOVA test prikazuje povezanost veće ekspresije HLA-DR molekule sa višim Ki-67 proliferativnim indeksom ( $p=0,007$ ).

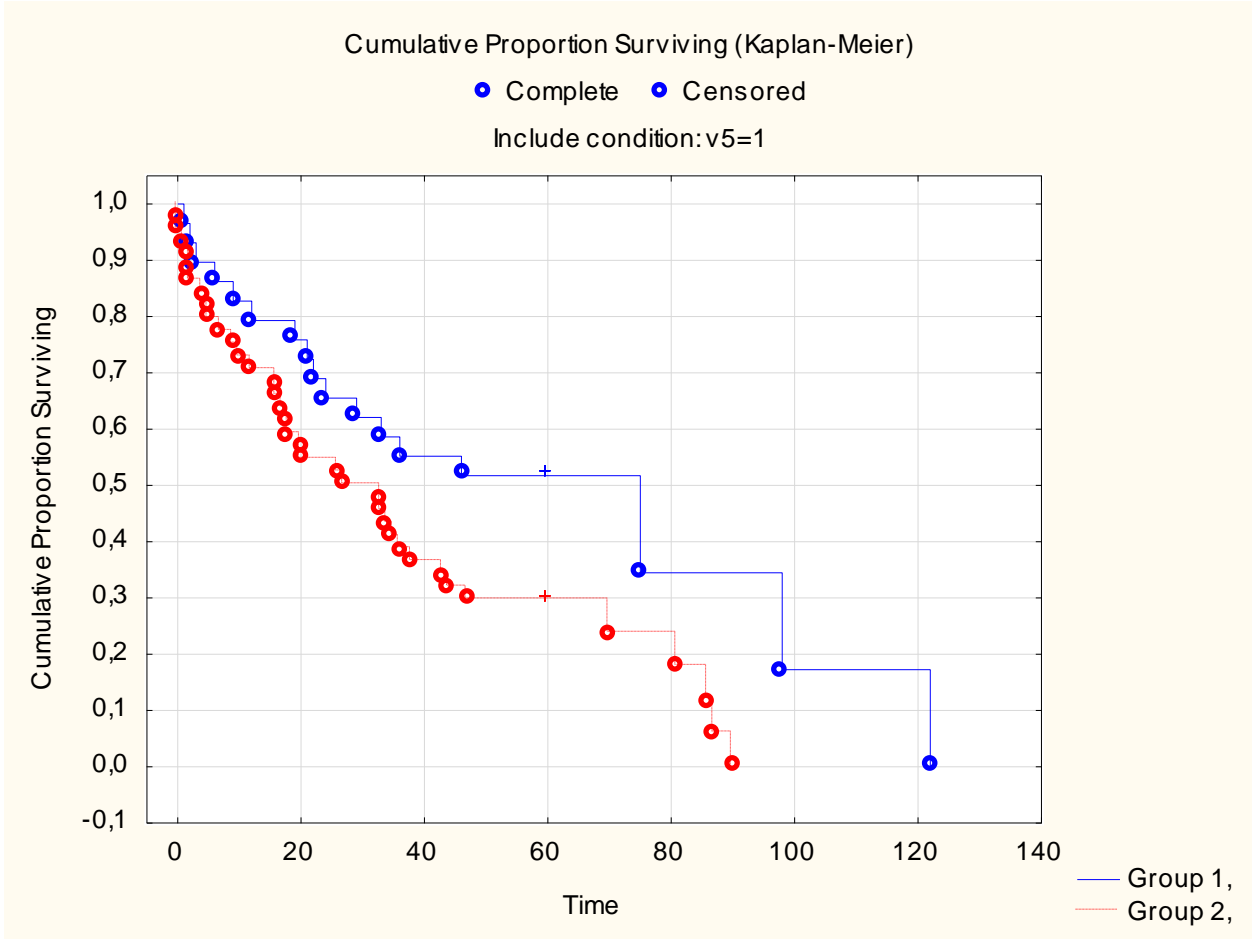
Na Slici 11 može se vidjeti proporcionalna povezanost između PD-1 ekspresije i HLA-DR ekspresije. Iako statistička analiza nije pokazala povezanost između HLA-DR ekspresije i

duljine preživljenja kod svih vrste NSSKP, na Slici 12 može se vidjeti kako je HLA-DR ekspresija ipak povezana sa kraćim preživljenjem kod adenokarcinoma pluća.



**Slika 11:** Kruskal-Waliss ANOVA test prikazuje povezanost veće ekspresije PD-1 molekule sa većom ekspresijom HLA-DR molekule u NSSKP. ( $p=0.0001$ ).





**Slika 12:** Kaplan-Meier graf pokazuje povezanost kraćeg preživljenja sa većim brojem HLA-DR pozitivnih makrofaga.

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju pokazana je statistički značajna korelacija PD-1 ekspresije na tumor infiltrirajućim limfocitima i različitih kliničkopatoloških podataka vezanih uz NSSKP. Opažena je proporcionalna povezanost PD-1 ekspresije i histološkog gradusa, odnosno patološkog stadija tumora. Uočeno je kako je veći broj PD-1 pozitivnih limfocita u tumorskom okolišu prisutan u uzorcima tkiva uznapredovalih karcinoma s lošijom prognozom u usporedbi s uzorcima tumora niskoga gradusa i stadija. U dosadašnjim istraživanjima ova obilježja su uglavnom komparirana sa ekspresijom PD-1 liganda (PD-L1) u tumorskim stanicama NSSKP, te je u različitim istraživanjima dokazana njihova međusobna povezanost. Prema Kim i sur. PD-L1 ekspresija je statistički značajno povezana s histološkim gradusom NSSKP, na način da je veći broj PD-L1 pozitivnih stanica prisutan kod tumora višeg gradusa [31], a ista povezanost postoji i prema Driver i sur [41].

Analizom preživljenja dobivena je obrnuto proporcionalna povezanost sa PD-1 ekspresijom na limfocitima u tumorskoj stromi. Utvrđeno je kako je veći broj PD-1 pozitivnih stanica bio prisutan u ispitanika s kraćim preživljenjem, što bi podupiralo hipotezu kako PD-1/PD-L1 signalni put ima ulogu u imunosupresiji i propagaciji tumora. Ovaj podatak je značajan, jer nema mnogo istraživanja koja su uspjela dokazati ovu povezanost. Nadalje, iako su neka istraživanja otkrila poveznicu između PD-L1 ekspresije i kraćega preživljenja [42,43], u mnogim studijama ta korelacija nije dokazana [31]. Naime, jedne od većih studija provedenih na ovu temu čak su dovele povećanu ekspresiju PD-L1 u NSSKP u vezu sa boljom prognozom, odnosno duljim preživljenjem [44,45].

Upravo zbog tih kontroverznih i nekonzistentnih rezultata bitno je povećati broj istraživanja koja se fokusiraju na te parametre kako bi dobili bolji uvid u ulogu PD-1/PD-L1 signalnog

puta. Osvrnuvši se na rezultate dobivene ovim istraživanjem, PD-1 ekspresija na T limfocitima u NSSKP mogla bi u budućnosti služiti kao prognostički biomarker NSSKP. Nedavne studije pokazale su veliki uspjeh u terapiji ciljanim blokatorima PD-1/PD-L1 signalnog puta u vidu produljenog preživljenja ispitanika (OS, eng. overall survival) i preživljenja bez progresije bolesti (PFS, eng. progression free survival) [46,47].

Jedan od ključnih koraka u terapiji blokatorima PD-1/PD-L1 signalnog puta je odabir pacijenta koji će dobro reagirati na tu terapiju. Imunohistokemijska detekcija PD-L1 u uzorcima tkiva NSSKP je za sada najčešće validirani biomarker koji služi za odabir podobnih pacijenata koji će dobiti terapiju, ali i prediktivni marker povoljnog odgovora na terapiju [48].

Međutim, mnogi PD-L1 pozitivni tumori ne odgovaraju na terapiju, dok neki PD-L1 negativni tumoru pokazuju dobar odgovor na terapiju blokatorima PD-1/PD-L1 signalnog puta [49].

Hallmand i sur. su u nedavnom kliničkom istraživanju pratili dvije skupine pacijenata sa NSSKP, od kojih je jedna skupina bila na terapiji inhibitorima PD-1/PD-L1 signalnog puta dok je druga skupina primala kemoterapiju. Uspjeli su pokazati kako je kod pacijenata na terapiji inhibitorima PFS značajno dulje, međutim ono nije ovisilo o ekspresiji PD-L1 molekule u tumoru [50].

Ovakvi rezultati dovode u pitanje ulogu PD-L1 liganda, i njegove ekspresije u NSSKP, kao prediktivnog biomarkera u odgovoru na terapiju PD-1 ili PD-L1 inhibitorima.

Iako pregledom literature nismo naišli na istraživanje koje povezuje PD-1 ekspresiju u NSSKP s odgovorom na terapiju inhibitorima, temeljem naših rezultata smatramo kako bi se moglo provesti takvo istraživanje i, ovisno o rezultatima, iskoristiti PD-1 molekula i njena ekspresija u NSSKP-a kao prediktivni biomarker za terapiju PD-1/PD-L1 inhibitorima.

Bitnu komponentu tumorskog mikrookoliša predstavljaju i makrofazi. Zadnjih nekoliko godina dokazana je njihova značajna uloga u razvoju i propagaciji samog tumora. Ovisno o drugim čimbenicima tumorskoga mikrookoliša, kao i o samim tumorskim stanicama, makrofazi mijenjaju svoja svojstva te mogu djelovati citotoksično ili protektivno prema tumorskim stanicama. Točna međustanična interakcija i čimbenici koji odlučuju kako će se makrofazi ponašati nisi poznati. Dva krajnja oblika makrofaga su M1 makrofazi, koji prema istraživanjima djeluju citotoksično, i M2 makrofazi, za koje se vjeruje da potiču proliferaciju tumora.

Razna istraživanja povezala su veću gustoću M1 makrofaga u uzorcima tumora sa specifičnom podvrstom NSSKP. Tako su prema Jackute i sur. M1 makrofazi zastupljeniji u adenokarcinomu pluća u odnosu na planocelularni karcinom, dok su Cao i sur. zaključili kako su u planocelularnom karcinomu pluća u većem broju prisutni M2 makrofazi [51, 52].

U našem istraživanju nismo uspjeli dobiti povezanost između postotka HLA-DR pozitivnih makrofagai histološkog podtipa NSSKP.

Analizom naših rezultata uočena je proporcionalna povezanost između HLA-DR ekspresije i Ki-67 indeksa. Prilikom pregleda literature nismo uspjeli pronaći radove koji dovode u korelaciju ekspresiju M1 makrofaga i indeks proliferacije, međutim neki radovi navode kako je ekspresija makrofaga i količina M2 makrofaga u tumorskom tkivu NSSKP u proporcionalnoj vezi s Ki-67 indeksom [53].

Povećana HLA-DR ekspresija nadalje je proporcionalno povezana s patološkim stadijem NSSKP. Ovi rezultati ne govore u prilog hipotezi kako M1 makrofazi djeluju citotoksično i sprječavaju daljnji napredak tumora, međutim, pošto je HLA-DR molekula osim na makrofazima prisutna i na manjoj populaciji T i B limfocita, moguće je da je i jedan njihov dio uklopljen u postotak HLA-DR pozitivnih makrofaga te smo zbog toga dobili ove rezultate.

U studiji koja je proučavala povezanost između preživljenja bolesnika sa multiplim mijelomom i HLA-DR ekspresije, dobivena je također proporcionalna povezanost s višim stadijem bolesti, ali i kraćim preživljenjem [54]. U našem istraživanju nije dokazana povezanost između duljeg preživljenja i većeg broja M1 makrofaga u NSSKP, no dobili smo pozitivnu korelaciju između kraćeg preživljenja i većeg broja M1 makrofaga u adenokarcinomima pluća.

U mnogim istraživanjima pokazana je povezanost između broja M1 makrofaga u tumorskom mikrookolišu i duljega preživljenja, što podupire teoriju kako M1 makrofazi imaju protektivnu ulogu i usporavaju napredak karcinoma [51, 55]. Međutim, bitno je napomenuti da postoje i druge studije koje su pokazale kako nema korelacije između broja makrofaga i prognoze tumora, odnosno duljine preživljenja, što se može protumačiti na više načina. Jedna od hipoteza je hipoteza „balansa makrofaga“, naime tumori su gledani u određenom trenutku razvoja a vjeruje se kako je broj makrofaga i njihova funkcija različita u različitim stadijima razvoja. Također, M1 i M2 makrofazi krajnje su forme polarizacije makrofaga, a upitna je uloga svih formi koje se nalaze između. Nadalje, takvi rezultati su mogući i zbog nedovoljno precizne fenotipizacije [38].

Proporcionalna povezanost između PD-1 ekspresije na TIL stanicama i HLA-DR ekspresije na makrofazima u tumorskoj stromi NSSKP, prikazana u našem istraživanju, predstavlja izrazito zanimljiv podatak. Ta povezanost može se tumačiti na više načina. Moguće je da samo pokazuje kako je u određenim tumorima bio prisutan veći broj stanica imunskog sustava, uključujući limfocite i makrofage, no međutim, neki podatci ukazuju kako makrofazi mogu na različite načine utjecati na tumor i druge komponente tumorskog mikrookoliša. Zong i suradnici su nedavno pokazali taj utjecaj na primjeru hepatocelularnog karcinoma. Njihovo

istraživanje pokazalo je kako M1 makrofazi potiču ekspresiju PD-L1 molekula na malignim stanicama karcinoma lučenjem IL-1 $\beta$ , što dovodi u pitanje njihovu protektivnu ulogu [55].

Druga istraživanja pokazala su kako terapija PD-1 inhibitorima dovodi do pretvorbe M2 makrofaga u M1 makrofage, što govori u prilog tome da PD-1/PD-L1 signalni put ima imunosupresivnu ulogu, odnosno da inhibira fagocitotičku aktivnost i potiče polarizaciju M2 makrofaga, a ti efekti su onda inhibirani anti PD-1 lijekovima [56]. Ovi rezultati pokazuju kako postoji određena veza između PD-1/PD-L1 signalnoga puta i polarizacije TAM, no ta veza nije u potpunosti razjašnjena te je potrebno njeno daljnje istraživanje.

Ograničenja ovog istraživanja su: subjektivna i semikvantitativna procjena broja obojenih stanica unutar uzorka tumorskoga tkiva. Nadalje moguća su manja odstupanja od realnog stanja ispitanika pošto su klinički podatci skupljani retrogradno iz liječničkih nalaza.

Iako uloga različitih formi makrofaga nije u potpunosti jasna, temeljem dosadašnjih rezultata smatra se kako bi se imunoterapijska strategija za borbu protiv tumora trebala fokusirati na privlačenje makrofaga i njihovu polarizaciju u M1 makrofage. Nadalje bi se trebala istraživati mogućnost pretvorbe M2 makrofaga u M1 makrofage. Za razvoj terapije potrebna su daljnja istraživanja koja detaljnije objašnjavaju ulogu TAM-a u NSSKP, kao i njihovu interakciju sa ostalim komponentama tumorskog mikrookoliša [37].

PD-1 molekula definitivno predstavlja vrlo važan faktor koji utječe na različite karakteristike tumora. Prisutna je u mnogim karcinomima, a PD-1/PD-L1 signalni put u posljednjih desetak godina u središtu je velikog broja istraživanja i predstavlja glavni cilj imunoterapije kod brojnih tumora, uključujući NSSKP. Iako su brojni znanstvenici istraživali ulogu PD-L1 liganda i njegovu ulogu u tumorima, mali broj njih istraživao je ulogu PD-1 molekule. Na temelju naših saznanja smatramo kako bi se trebao provesti veći broj istraživanja usmjerenih na PD-1

molekulu te da bi njena ekspresija na limfocitima u tumorskom intersticiju potencijalno mogla služiti kao prognostički i prediktivni biomarker.

U konačnici, smatram kako je uloga tumorskog mikrookoliša na razvoj i progresiju NSSKP izrazito velika, te da bi nam daljnje istraživanje međusobnih interakcija sastavnica tumorskog mikrookoliša, kao i njihovih interakcija sa tumorskim stanicama moglo donijeti značajan iskorak u razumijevanju tumora kao i u njihovom liječenju.

## 6. ZAKLJUČCI

1. PD-1 ekspresija prisutna je u tumor infiltrirajućim limfocitima (TIL) , ali i drugim stanicama intersticija NSSKP-a, međutim značajno slabije.
2. PD-1 ekspresija proporcionalno je povezana sa histološkim gradusom i patološkim stadijem NSSKP.
3. PD-1 ekspresija obrnuto je proporcionalno povezana s preživljenjem oboljelih od NSSKP.
4. Prisutnost M1 makrofaga određena je na temelju morfoloških karakteristika i obojenosti anti HLA-DR protutijelom.
5. HLA-DR ekspresija proporcionalno je povezana sa patološkim stadijem NSSKP te sa Ki-67 proliferativnim indeksom.
6. Nije dokazana statistički značajna povezanost između HLA-DR ekspresije i preživljenja oboljelih od NSSKP.
7. Dokazana je statistički značajna povezanost između HLA-DR i PD-1 ekspresije u NSSKP.

## 7. SAŽETAK

Ne-sitnostanični karcinomi pluća (NSSKP) čine 85 % svih karcinoma pluća. Zbog kasne dijagnostike i poteškoća u liječenju posljednjih se godine sve veći značaj daje ciljanoj terapiji usmjerenoj na određene receptore, enzime i komponente imunološkog sustava unutar tumorskog mikrookoliša. Mikrookoliš solidnih tumora je kompleksan, sastoji se od stanica koje čine stromalne i mikrovaskularne strukture, te onih koje sudjeluju u imunološkom odgovoru. Receptor programirane stanične smrti-1 (PD-1) je značajan koreceptor eksprimiran na T-limfocitima. Njegov ligand (PD-L1) može se naći eksprimiran na tumorskim stanicama, a vezivanjem na PD-1 uzrokuje inhibiciju aktivacije i efektorskih funkcija T-limfocita. Na taj način, PD-1/PD-L1 signalni put uzrokuje imunosupresiju i potiče tumorski rast što je predmet istraživanja različitih studija. Makrofazi mogu polarizirati u M1 i M2 makrofage. Klasično aktivirani M1 makrofazi imaju citotoksičnu ulogu dok M2 makrofazi pokazuju imunosupresivna svojstva. U našem istraživanju analizirali smo ekspresiju PD-1 molekule na limfocitima u stromi NSSKP i usporedili je sa različitim kliničkopatološkim podacima i preživljenjem. Statističkom obradom podataka vidljiva je proporcionalna povezanost PD-1 ekspresije s histološkim gradusom i patološkim stadijem tumora ( $p=0,050$  i  $p=0,004$ ). Nadalje, PD-1 ekspresija je povezana sa kraćim preživljenjem ( $p=0,029$ ). Ovi rezultati govore u prilog ulozi PD-1 molekule kao prognostičkom markeru. Analizirali smo ekspresiju HLA-DR pozitivnih makrofaga (M1) i usporedili je s istim kliničkopatološkim obilježjima. Analizom rezultata dobivena proporcionalna povezanost HLA-DR ekspresije sa proliferativnim indeksom i patološkim stadijem ( $p=0,007$  i  $p=0,029$ ). Dokazana je i povezanost veće HLA-DR ekspresije sa PD-1 ekspresijom. Ovi rezultati ne pokazuju jasno koja je uloga M1 makrofaga u tumorskom mikrookolišu, ali upućuju na njihovu važnost



## 8. SUMMARY

Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for 85% of all lung cancers. Due to the late diagnosis and difficulties in treatment, increasing importance is given to targeted therapy targeting certain receptors, enzymes and components of the immune system within the tumor microenvironment. The microenvironment of solid tumors is complex, consisting of cells that make up stromal and microvascular structures, and those that participate in the immune response. The programmed cell death receptor-1 (PD-1) is a significant co-receptor expressed on T-lymphocytes. Its ligand (PD-L1) can be found expressed on some tumor cells. PD-L1 binding to PD-1 causes inhibition of T-lymphocyte activation and effector functions. Thus, the PD-1 / PD-L1 signaling pathway causes immunosuppression and promotes tumor growth which has been the subject of research by various studies. Macrophages can polarize into M1 and M2 macrophages. Classically activated M1 macrophages play a cytotoxic role, while M2 macrophages show immunosuppressive properties. In our study, we analyzed the expression of the PD-1 molecule on lymphocytes in the stroma of the NSCLC and compared it with different clinicopathological data and survival. Statistical analysis of the data showed a proportional relationship of PD-1 expression with histological grade and pathological stage of the tumor ( $p=0,050$  i  $p=0,004$ ). Furthermore, PD-1 expression is associated with shorter survival ( $p=0,029$ ). These results support the role of the PD-1 molecule as a prognostic marker. We analyzed the expression of HLA-DR positive macrophages (M1) and compared it with the same clinicopathological features. The analysis of the results revealed a proportional relationship of HLA-DR expression with proliferative indeks and pathological stage ( $p=0,007$  i  $p=0,029$ ). The association of higher HLA-DR expression with PD-1 expression has also been demonstrated. These results do not clearly show the role of M1 macrophages in the tumor microenvironment, but suggest their importance

## 9. LITERATURA

1. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2017., Bilten 42, Zagreb, 2020.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2018. godini, Zagreb, 2019.
3. Damjanov I. i sur: Patologija, Zagreb 2014.
4. Piñeros M, Sierra MS, Forman D (2016). Etiology of lung cancer (C33-34) in Central and South America. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
5. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med.* 2011;32(4):605–644. doi:10.1016/j.ccm.2011.09.001
6. MSD priručnik dijagnostike i terapije: Karcinom pluća. [pristupljeno: 05.06.2020]  
Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/pulmologija/tumori-pluca/karcinom-pluca>.
7. Kanaji N, Watanabe N, Kita N, et al. Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer. *World J Clin Oncol.* 2014;5(3):197–223. doi:10.5306/wjco.v5.i3.197
8. Hollings PS. Diagnostic imaging of lung cancer. *European Respiratory Journal* 2002 19: 722-742; DOI: 10.1183/09031936.02.00280002
9. Tillich M, Kammerhuber F, Reittner P, Riepl T, Stoeffler G, Szolar DH. Detection of pulmonary nodules with helical CT: comparison of cine and film-based viewing. *Am J Roentgenol* 1997;169:1611–1614
10. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol.* 2017;7:193. Published 2017 Aug 28.  
doi:10.3389/fonc.2017.00193

11. Kalemkerian GP, Akerley W, Bogner P, et al. Small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013;11(1):78–98. doi:10.6004/jnccn.2013.0011
12. The American Cancer Society medical and editorial content team. Lung Cancer Survival Rates. [pristupljeno: 05.06.2020]. Dostupno na: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.
13. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res*. 2016;5(3):288–300. doi:10.21037/tlcr.2016.06.07
14. Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, Thunnissen E. Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens. *European Respiratory Review* Jun 2017, 26 (144) 170007; DOI: 10.1183/16000617.0007-2017
15. Luo, S.Y., Lam, D.C. Oncogenic driver mutations in lung cancer. *Transl Respir Med* 1, 6 (2013). <https://doi.org/10.1186/2213-0802-1-6>
16. Bethune G, Bethune D, Ridgway N, Xu Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *J Thorac Dis*. 2010;2(1):48–51.
17. Zhang YL, Yuan JQ, Wang KF, et al. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(48):78985–78993. doi:10.18632/oncotarget.12587
18. Greulich H. The genomics of lung adenocarcinoma: opportunities for targeted therapies. *Genes Cancer*. 2010;1(12):1200–1210. doi:10.1177/1947601911407324
19. Chirieac LR. Ki-67 expression in pulmonary tumors. *Transl Lung Cancer Res*. 2016;5(5):547–551. doi:10.21037/tlcr.2016.10.13
20. The American Cancer Society medical and editorial content team. Treatment Choices for Non-Small Cell Lung Cancer, by Stage. [pristupljeno: 05.06.2020]. Dostupno na: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/treating-non-small-cell/by-stage.html>

21. Zarogoulidis P, Lampaki S, Chinelis P, Lazaridis G, Baka S, Rapti A. Tyrosine Kinase Inhibitors for Non-Small Cell Lung Cancer and Eye Metastasis: Disease Relapse or a New Entity?. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol*. 2016;5(4):132–135.
22. Gridelli C, Peters S, Sgambato A, Casaluce F, Adjei AA, Ciardiello F. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer treatment reviews*. 2014 Mar;40(2):300-6. doi: 10.1016/j.
23. Graves EE, Maity A, Le QT. The tumor microenvironment in non-small-cell lung cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2010;20(3):156–163. doi:10.1016/j.semradonc.2010.01.003
24. Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(1):9–31. doi:10.1038/s41568-018-0081-9
25. Ni L, Dong C. New B7 Family Checkpoints in Human Cancers. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(7):1203–1211. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0761
26. Ostrand-Rosenberg S, Fenselau C. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Immune-Suppressive Cells That Impair Antitumor Immunity and Are Sculpted by Their Environment. *J Immunol*. 2018;200(2):422–431. doi:10.4049/jimmunol.1701019
27. He, J., Hu, Y., Hu, M. et al. Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Rep* 5, 13110 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep13110>
28. Ji M, Liu Y, Li Q, et al. PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. *J Transl Med*. 2015;13:5. Published 2015 Jan 16. doi:10.1186/s12967-014-0373-0

29. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis V A. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Frontiers in Immunology* 2016;550;5.Doi:10.3389/fimmu.2016.00550
30. Mu C Y, Huang J A, Chen Y, Chen C, Zhang X G. 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. *J. Med Oncol.* 28(3):682-8. (2011)
31. Kim H, Kwon HJ, Park SY, Park Y, Park E, Chung JH. Clinicopathological analysis and prognostic significance of programmed cell death-ligand 1 protein and mRNA expression in non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 2018;13(6):e0198634. Published 2018 Jun 1. doi:10.1371/journal.pone.0198634
32. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 1;10(15):5094-100
33. Kleffel S, Posch C, Barthel SR, et al. Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell.* 2015;162(6):1242–1256. doi:10.1016/j.cell.2015.08.052
34. Soo RA. Shedding light on the molecular determinants of response to anti-PD-1 therapy. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4(6):816–819. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2015.05.06
35. Gong, J., Chehrazi-Raffle, A. Reddi, S, Salgia, R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: A comprehensive review of registration trials and future considerations. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2018;doi: 10.1186/s40425-018-0316-z
36. IASLC. IASLC atlas of PD-L1 immunohistochemistry testing in lung cancer. Colorado: Editorial Rx Press; 2017.

37. Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med.* 2011;9:216. Published 2011 Dec 16.  
doi:10.1186/1479-5876-9-216
38. Quatromoni JG, Eruslanov E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res.* 2012;4(4):376–389.
39. C.M. Ohri, A. Shikotra, R.H. Green, D.A. Waller, P. Bradding: Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur Respir J* 2009; 33: 118–126. doi: 10.1183/09031936.00065708
40. Junliang M, Lunxu L, Guowei C, Nanbin Y, Fuqiang D, Zongbing Y. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *Ma et al. BMC Cancer* 2010, 10:112 <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/112>
41. Driver BR, Miller RA, Miller T, et al. Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Expression in Either Tumor Cells or Tumor-Infiltrating Immune Cells Correlates With Solid and High-Grade Lung Adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(11):1529-1532.  
doi:10.5858/arpa.2017-0028-OA
42. Qiu Y, Jiang J, Zhang M, Qin Y. Positive PD-L1 expression is predictive for patients with advanced EGFR wild-type non-small cell lung cancer treated with gemcitabine and cisplatin. *Oncol Lett.* 2019;18(1):161-168. doi:10.3892/ol.2019.10302
43. Wang A, Wang HY, Liu Y et al. 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.
44. Cooper WA, Tran T, Vilain RE, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer.* 2015;89(2):181-188.  
doi:10.1016/j.lungcan.2015.05.007

45. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest.* 2014;94(1):107-116.  
doi:10.1038/labinvest.2013.130
46. 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.
47. Schulze AB, Schmidt LH. PD-1 targeted Immunotherapy as first-line therapy for advanced non-small-cell lung cancer patients. *J Thorac Dis.* 2017;9(4):E384-E386.  
doi:10.21037/jtd.2017.03.118
48. Marchetti A, Di Lorito A, Buttitta F. Why anti-PD1/PDL1 therapy is so effective? Another piece in the puzzle. *J Thorac Dis.* 2017;9(12):4863-4866. doi:10.21037/jtd.2017.11.105
49. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015;348(6230):124-128. doi:10.1126/science.aaa1348
50. Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N Engl J Med.* 2018;378(22):2093-2104.  
doi:10.1056/NEJMoa1801946
51. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, et al. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC Immunol.* 2018;19(1):3. Published 2018 Jan 24. doi:10.1186/s12865-018-0241-4
52. Cao L, Che X, Qiu X, et al. M2 macrophage infiltration into tumor islets leads to poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res.* 2019;11:6125-6138.  
Published 2019 Jul 4. doi:10.2147/CMAR.S199832

53. Sumitomo R, Hirai T, Fujita M, Murakami H, Otake Y, Huang CL. M2 tumor-associated macrophages promote tumor progression in non-small-cell lung cancer. *Exp Ther Med.* 2019;18(6):4490-4498. doi:10.3892/etm.2019.8068
54. Wang H, Zhou X, Zhu JW, Ye JN, Guo HF, Sun C. Association of CD117 and HLA-DR expression with shorter overall survival and/or progression-free survival in patients with multiple myeloma treated with bortezomib and thalidomide combination treatment without transplantation. *Oncol Lett.* 2018;16(5):5655-5666. doi:10.3892/ol.2018.9365  
Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer.* 2010;10:112. Published 2010 Mar 25. doi:10.1186/1471-2407-10-112
55. Zong Z, Zou J, Mao R, et al. M1 Macrophages Induce PD-L1 Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells Through IL-1 $\beta$  Signaling. *Front Immunol.* 2019;10:1643. Published 2019 Jul 16. doi:10.3389/fimmu.2019.01643
56. Dhupkar P, Gordon N, Stewart J, Kleinerman ES. Anti-PD-1 therapy redirects macrophages from an M2 to an M1 phenotype inducing regression of OS lung metastases. *Cancer Med.* 2018;7(6):2654-2664. doi:10.1002/cam4.1518



## 10. ŽIVOTOPIS

Patricia Božičević rođena je 10.07.1995. godine u Rijeci. Pohađala je Osnovnu školu Čavle nakon čega upisuje Gimnaziju Andrije Mohorovičića Rijeka, gdje završava program opće gimnazije 2014. godine. Medicinski Fakultet Sveučilišta u Rijeci upisala je 2014. godine te je isti završila u roku 2020 godine.

Tokom studiranja bila je aktivna članica udruge CroMSIC te je u dva navrata sudjelovala u profesionalnim studentskim razmjenama. U kolovozu 2018. godine bila je na razmijeni u Innsbrucku na odjelu interne medicine, dok je kolovoz 2019. godine provela u Njemačkom Heidelbergu na odjelu vaskularne i endovaskularne kirurgije. Dobitnica je dvije dekanove nagrade za najboljeg studenta, za akademsku godinu 2016/2017 i 2018/2019.

Od 2015. godine obnaša dužnosti demonstratora na Katedri za anatomiju, dok tokom četvrte, pete i šeste godine studija istu dužnost vrši na Katedri za internu medicinu. Na zadnjoj godini studija tome pridodaje i demonstrature na katedri za anesteziologiju, reanimatologiju, hitnu i intenzivnu medicinu.

Od stranih jezika tečno govori engleski i njemački, a posjeduje i osnovno znanje španjolskog jezika.