

# Značaj izražaja IMP3 I PD-L1 u operabilnom karcinomu pluća nemalih stanica

---

Šimundža, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2024

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:024260>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-22**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**IVAN ŠIMUNDŽA**

**ZNAČAJ IZRAŽAJA IMP3 I PD-L1 U OPERABILNOM  
KARCINOMU PLUĆA NEMALIH STANICA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2023.**

Doktorski rad izrađen je u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju  
Kliničkoga bolničkog centra Split.

Voditeljica rada: prof. prim. dr. sc. Merica Glavina Durdov

## **Zahvala**

*Od srca zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Merici Glavini Durdov na motivaciji, podršci i savjetima u cjelokupnom postupku nastanka ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr. sc. Katarini Vukojević na nesebičnoj potpori i vodstvu te korisnim savjetima.*

*Hvala mojim kirurškim mentorima doc.dr.sc. Draganu Krniću i dr. Jošku Juričiću na njihovu značajnom doprinosu prilikom provedbe istraživanja i izrade ove disertacije.*

*Mojoj obitelji, supruzi Rini i kćerima Marti, Mariti i Mariji, posvećujem ovu disertaciju i zahvaljujem na strpljenju i bezgraničnoj podršci kroz sve ove godine.*

## SADRŽAJ PREMA POGLAVLJIMA

<b>1.</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Epidemiologija i etiologija karcinoma pluća .....	2
1.2.	Klinička slika .....	3
1.3.	Dijagnostički postupci.....	3
1.4.	Patohistološka klasifikacija karcinoma pluća .....	5
1.4.1.	Adenokarcinom .....	6
1.4.2.	Planocelularni karcinom .....	8
1.4.3.	Karcinom velikih stanica .....	8
1.4.4.	Neuroendokrini karcinomi malih stanica i velikih stanica .....	9
1.5.	TNM klasifikacija karcinoma pluća i stadiji bolesti .....	11
1.6.	Liječenje karcinoma pluća .....	14
1.6.1.	Kirurško liječenje .....	14
1.6.2.	Onkološka terapija i radioterapija .....	15
1.7.	Inhibicijski receptori i njihovi ligandi .....	17
1.8.	IMP3 i agresivnost tumora .....	18
<b>2.</b>	<b>HIPOTEZE I CIJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>23</b>
3.1.	Ispitanici .....	24
3.2.	Metode .....	26
3.3.	Statistička analiza .....	29
3.4.	Etička dozvola .....	29

<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>30</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>48</b>
5.1.	Povezanost izražaja IMP3 u tumorskim stanicama s kliničko-patološkim pokazateljima i mjerama ishoda .....	49
5.2.	Povezanost izražaja PD-L1 u tumorskim stanicama s kliničko-patološkim pokazateljima i mjerama ishoda .....	50
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK .....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>59</b>
<b>9.</b>	<b>POPIS LITERATURE .....</b>	<b>61</b>
<b>10.</b>	<b>KRATKI ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>69</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ADC	adenokarcinom
BTLA	engl. <i>B and T lymphocyte attenuator</i>
CK5/6	citokeratin 5/6
CTLA-4	engl. <i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
DFS	engl. <i>disease free survival</i> , vrijeme bez povrata bolesti
IARC	engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IASLC	engl. <i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>
IFN- $\gamma$	interferon gama
IMP3	engl. <i>insulin-like growth factor II m-RNA-binding protein 3</i>
IGF-2	engl. <i>insulin-like growth factor 2</i>
Ir	inhibicijski receptori
ITAM	engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
LAG3	engl. <i>lymphocyte-activation gene 3</i>
LCMV	engl. <i>lymphocytic choriomeningitis virus</i>
NSCLC	engl. <i>non-small cell lung cancer</i>
NSCLC-NOS	engl. <i>non-small cell lung cancer non other specified</i>
OS	engl. <i>overall survival</i> , ukupno preživljenje
PD-1	engl. <i>programmed death receptor-1</i>
PD-L1	engl. <i>programmed death receptor ligand-1</i>
SCLC	engl. <i>small cell lung cancer</i>

SCC	engl. <i>squamous cell carcinoma</i>
STAS	engl. <i>spreading through air spaces</i>
TIM 3	engl. <i>T-cell immunoglobulin and mucin domain 3</i>
TKI	engl. <i>thyrosine kinase inhibitor</i>
TNM	engl. <i>tumor node metastasis</i>
TTF-1	engl. <i>thyroid transcription factor-1</i>



**UVOD**

## 1.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA KARCINOMA PLUĆA

U 2020. godini od karcinoma pluća oboljelo je 2,2 milijuna ljudi (1). U svijetu je karcinom pluća prvi uzrok smrti od malignih bolesti, a prosječno petogodišnje preživljenje iznosi 13 % (2). Prema predviđanjima Europske unije za 2023. godinu smrtnost od raka pluća u Europskoj uniji i Velikoj Britaniji zadržat će opadajući trend ponajprije zahvaljujući duhanskoj kontroli, što treba kontinuirano poticati (3). Prema tim podacima trend smrtnosti za muškarce povoljan je u svim dobnim skupinama, a i dalje nepovoljan za žene starije od 65 godina. U Hrvatskoj je prema podacima Registra za rak u 2020. godini ukupna incidencija raka pluća bila 76,2/100 000 i ukupni mortalitet 69,6/100 000 (4). Međutim, petogodišnje preživljenje novooboljelih u razdoblju od 2012. do 2016. u našoj županiji veće je od hrvatskog prosjeka, 15 % prema 10 % (5). Visoka stopa smrtnosti od karcinoma pluća u Hrvatskoj potaknula je 2020. godine usvajanje Nacionalnog programa probira ranog otkrivanja raka pluća niskodoznom kompjutoriziranom tomografijom (6). Probirom su obuhvaćene osobe u dobi od 50 do 75 godina, koje su aktivni pušači ili su prestali pušiti unutar 15 godina prije probira uz pušački staž od minimalno 30 godina (*30 pack/year*). Iako je pandemija COVID-19 prve dvije godine ometala implementaciju navedenog programa, dosadašnji rezultati ohrabruju jer je do siječnja 2023. probirom bilo obuhvaćeno 13 000 osoba, a rak pluća otkriven je u njih 134, od kojih je polovina nakon pravovremene operacije vjerojatno izliječena (7).

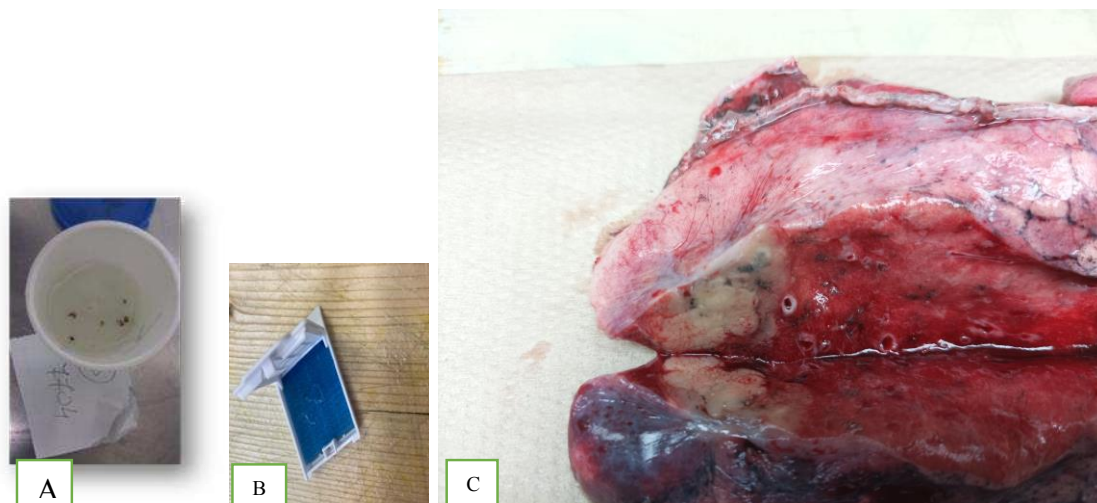
Etiologija karcinoma pluća povezana je s aktivnim i pasivnim pušenjem, s onečišćenjem zraka i radnog okoliša te s oštećenjem plućnog parenhima drugim agensima i bolestima u kombinaciji s genetskim čimbenicima. Prema Globalnoj statistici raka za 2020. godinu u Sjedinjenim Američkim Državama broj smrti povezan s rakom pluća između 1991. i 2019. godine pao je za 41 % zahvaljujući protupušačkoj kampanji započetoj 1965. godine. S druge strane, u Kini je od 1973. do 2016. godine zabilježen porast smrtnosti od raka pluća, koji je posljednjih 20 godina uz rak jetre postao vodeći uzrok smrti od raka u urbanim i ruralnim područjima te zemlje (8). Kao glavni uzrok raka pluća u Kini naveden je duhanski dim, pa bi primarna strategija trebala biti kontrola pušenja duhana. Međutim, u promatranom razdoblju godišnje je rasla incidencija adenokarcinoma u žena nepušača i adenokarcinoma u oba spola, pa se kao uzrok spominje onečišćenje zraka (9). U Hrvatskoj se aktivno i pasivno pušenje smatra najvažnijim uzrokom raka pluća, ali se protupušačka kampanja sustavno ne provodi.

## **1.2. KLINIČKA SLIKA**

Karcinom pluća obično se kasno otkriva jer plućna popustljivost dopušta bezbolan rast tumora u plućnom parenhimu (10). Bolesnici, njih 80 – 90 %, imaju simptome u vrijeme inicijalne dijagnoze, a u 5 – 15 % slučajeva bolest se slučajno otkrije u sklopu kakve druge pretrage. Prvi simptom bolesti obično je dugotrajan kašalj. Konstitucijski su simptomi mršavljenje, povišena tjelesna temperatura, umor i slabost. Kod centralno smještenih tumora simptomi su dugotrajan kašalj, hemoptiza, upala pluća ili zaduha. Zbog širenja tumora u prsištu može se javiti maligni pleuralni izljev, sindrom gornje šuplje vene, disfagija zbog kompresije jednjaka, promuklost zbog infiltracije povratnog živca, Hornerov sindrom ili Pancoastov sindrom. Ekstratorakalne hematogene i limfogene metastaze najčešće su u jetri, nadbubrežnoj žlijezdi, središnjemu živčanom sustavu i kostima, a očituju se simptomima zahvaćenog organa. Tako metastaza u nadbubrežnu žlijezdu može izazvati znakove sekundarne Adisonove bolesti, a metastaza u kosti bolnost i hiperkalcemiju. Moždane metastaze nađu se u 5 – 40 % slučajeva, najčešće u bolesnika s karcinomom malih stanica. Mogu biti asimptomatske ili se prezentirati glavoboljom i mučninom, vrtoglavicom, epileptičkim napadajem ili drugim neurološkim i psihičkim poremećajima. Paraneoplastični sindromi mogu zahvatiti sve organske sustave, a prezentiraju se u 10 % oboljelih. Nastaju zato što tumorske stanice luče funkcionalne peptide/hormone ili imunološki sustav neodgovarajuće reagira na normalne stanice domaćina.

## **1.3. DIJAGNOSTIČKI POSTUPCI**

Pri sumnji na rak pluća u inicijalnoj dijagnostičkoj obradi bolesnika, osim temeljite anamneze, kliničkog pregleda i laboratorijskih nalaza, obvezne su slikovne metode i histološka analiza (11). U slikovne metode ubrajaju se rendgenska snimka pluća, MSCT prsišta, trbuha i zdjelice, a ovisno o stadiju bolesti i histološkom tipu slikovna se obrada nadopunjuje i s MR-om ili MSCT-om mozga, PET-CT-om, endobronhalnim ultrazvukom i endoezofagealnim ultrazvukom. Uzorak tkiva ili stanica za morfološku analizu najčešće se dobiva bronhoskopski, rjeđe transtorakalnom biopsijom vođenom MSCT-om ili kirurškim putem (Slika 1.). Transtorakalnu biopsiju izvode interventni radiolozi pod kontrolom CT-a. Nakon lokalne aplikacije anestetika u odgovarajuću torakalnu regiju iglenom uvodnicom širine 17G pristupi se tumorskom procesu i bioptira biopsijskim pištoljem širine 18G.



Slika 1. Uzorak tumorskog tkiva karcinoma pluća: A) bronhoskopska biopsija, B) transtorakalna biopsija, C) kirurški preparat. Izvor: arhiva Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

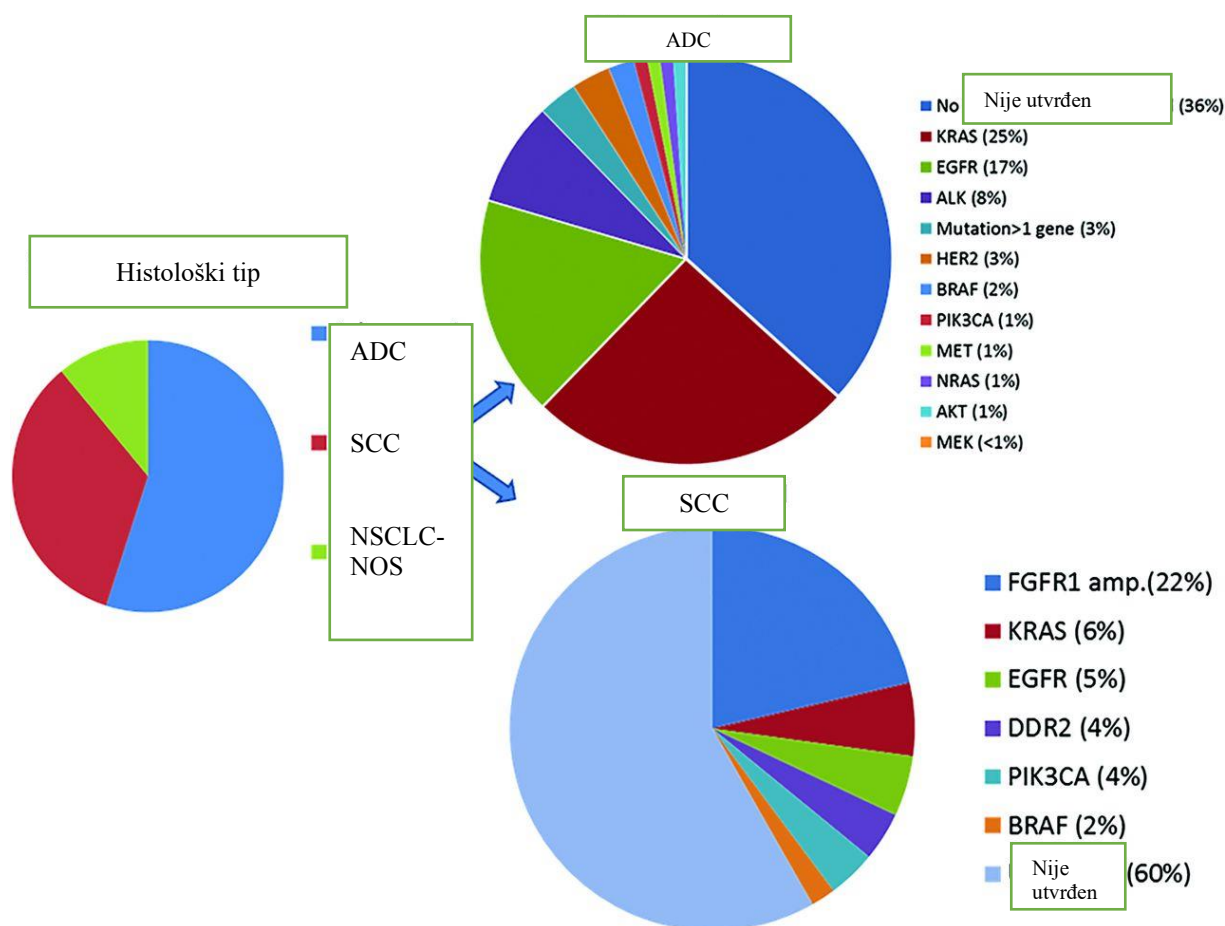
Slikovnim pretragama opisuje se najveći promjer primarnog tumora, moguća proširenost u druge dijelove pluća/druge organe i stanje medijastinalnih limfnih čvorova. Na MSCT-u suspektnim se smatra limfni čvor čiji je kraći promjer veći od 1 cm, a za supkardinalnu skupinu ako je veći od 1,5 cm. Skupine regionalnih limfnih čvorova specifične za karcinom pluća podijeljene su u 14 razina koje su određene anatomskim granicama (12). Širenje metastatskog tumora u regionalne intrapulmonalne i hilarne limfne čvorove (skupina N1), medijastinalne (N2) ili supraklavikularne i kontralateralne hilarne limfne čvorove (skupina N3) nije uvijek susljedno, nego može preskakati (engl. *skip*) sljedeću skupinu, pa se tada zove *skip* metastaza. U određenom stadiju bolesti mogu postojati razlike u operabilnosti, ovisno o N kategoriji i supklasifikaciji nodalne bolesti.

Nakon dijagnostičke obrade svakog bolesnika s dijagnosticiranim karcinomom pluća treba prikazati na multidisciplinarnom timu za tumore pluća, koji donosi odluku o liječenju. Liječenje raka pluća obično je konzervativno, a u 30 % slučajeva operacijsko. Osim stadija bolesti određenoga prema kliničkoj TNM klasifikaciji, operabilnost ovisi i o tipu karcinoma. Naime, karcinom malih stanica (SCLC od engl. *small cell lung cancer*) u trenutku dijagnoze obično je diseminirana bolest te se u pravilu ne liječi kirurški. Za bolesnika s karcinomom nemalih stanica (NSCLC od engl. *non-small cell lung cancer*) u ranom stadiju bolesti indicirano je kirurško liječenje. Ovisno o konačnom patohistološkom nalazu, indicira se adjuvantna terapija. Kasni stadiji bolesti liječe se sistemskom terapijom. Bolesnici s rakom pluća često imaju komorbiditete, što dodatno smanjuje broj kandidata za operaciju.

## 1.4. PATOHISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA KARCINOMA PLUĆA

Tradicionalna podjela na SCLC i NSCLC praktična je i danas. Bolesnici sa SCLC-om u trenutku inicijalne dijagnoze obično imaju intratorakalno/udaljeno proširenu neoperabilnu bolest. Na NSCLC otpada 80 %, a na SCLC 20 % dijagnosticiranih karcinoma pluća. Prema klasifikaciji karcinoma pluća Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2020. godine najčešći tipovi NSCLC-a su adenokarcinom (ADC) i karcinom pločastih stanica (SSC) (13). U slučaju slabo diferenciranih NSCLC-a, primjena specifičnih imunohistokemijskih biljega kao što su TTF-1, Napsin A, p40 i CK5/6 pomaže odrediti histološki tip (14).

Karcinomi pluća imaju različite genske mutacije, od kojih su neke ključne za rast i diobu stanice (15). Na Slici 2. prikazane su vodeće mutacije u karcinomu pluća nemalih stanica.



Slika 2. Vodeće mutacije u adenokarcinomu i planocelularnom karcinomu pluća. ADC: adenokarcinom; SCC planocelularni karcinom; NSCLC-NOS karcinom nemalih stanica - drugačije nespecificiran. Izvor: *Rolfo C i sur. Improvement in lung cancer outcomes with targeted therapies: an update for family physicians. J Am Board Fam Med. 2015; 28:124–33.*

Pri dijagnozi sve bolesnike s neskvamoznim rakom pluća nemalih stanica i mali dio bolesnika sa skvamoznim karcinomom (nepušači i/ili mlađi bolesnici) treba testirati na postojanje genskih alteracija za koje postoji učinkovita terapija: EGFR, ALK, ROS 1, MET, RET, BRAF, HER 2, KRAS i NTRK. Takve tzv. driver mutacije nalaze se u oko 50 % bolesnika s adenokarcinomom i one imaju odličnu prediktivnu vrijednost jer otvaraju put personaliziranom liječenju (16-18)

#### 1.4.1. Adenokarcinom

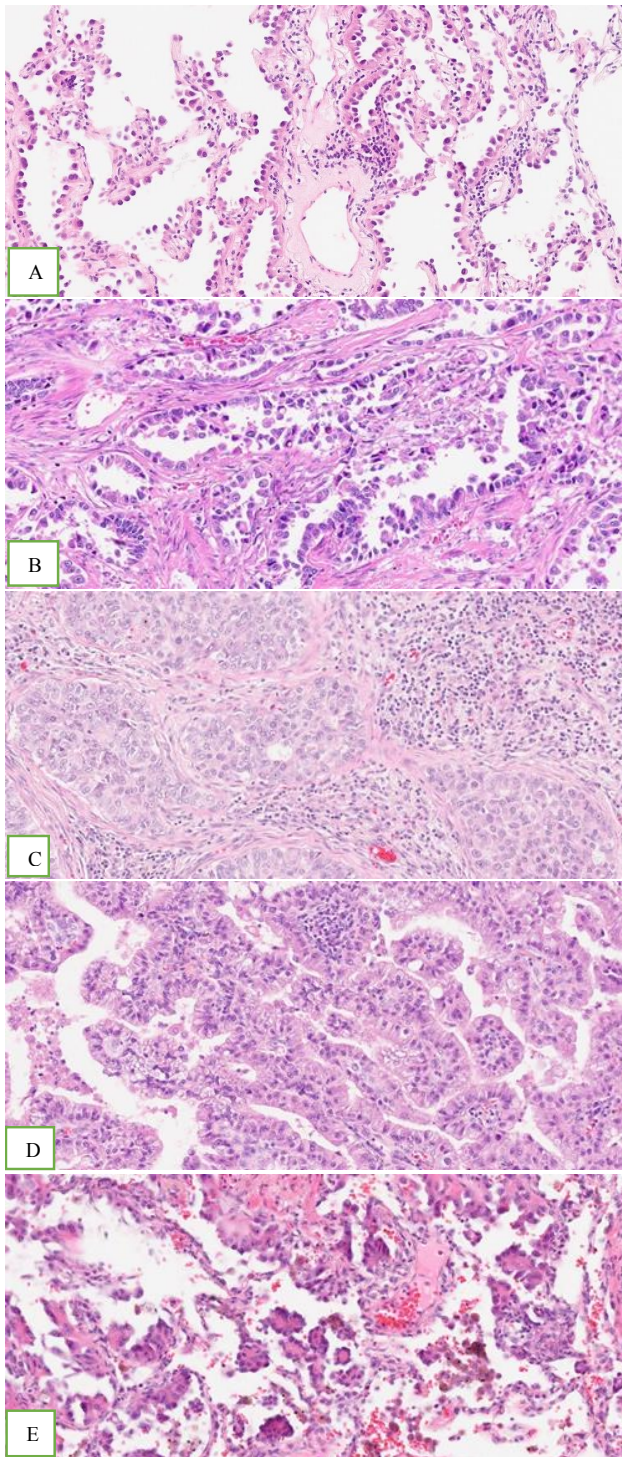
Invazivni nemucinozni adenokarcinom nalazi se u 40 % dijagnosticiranih bolesnika s rakom pluća, a čak u 70 % reseciranih karcinoma pluća (15). Incidencija adenokarcinoma u porastu je posljednjih nekoliko desetljeća. Imunohistokemijski, adenokarcinomi pluća u 85 % slučajeva izražavaju TTF-1 i/ili Napsin A.

Prema klasifikaciji SZO-a pet je podtipova ADC-a: lepidički, acinarni, papilarni, mikropapilarni i solidni (Slika 3.). Lepidički podtip građen je od atipičnih pneumocita koji rastu duž stijenke alveola i mogu imati invazivnu komponentu. Acinarni podtip karakteriziran je nepravilnim žljezdanim formacijama u miofibroblastičnoj stromi. Papilarni podtip građen je od fibrovaskularnih resica obloženih zloćudnim epitelom. Solidni podtip građen je od tračaka poligonalnih zloćudnih epitelnih stanica. Mikropapilarni podtip građen je od papilarnih nakupina bez fibrovaskularne osnove koje plutaju u zračnim prostorima i invadiraju stromu. U adenokarcinomu i drugim operiranim karcinomima pluća opisan je fenomen širenja kroz zračne prostore (engl. *spreading through air spaces* – STAS) u obliku mikropapila, solidnih gnijezda ili diskohezivnih pojedinačnih tumorskih stanica. Rijetki tipovi su invazivni mucinozni adenokarcinom, koloidni karcinom, fetalni karcinom i enterički karcinom.

Predominantni histološki podtip u operiranom nemucinoznom adenokarcinomu povezan je s prognozom pa tako lepidički podtip ima najbolju, acinarni i papilarni osrednju, a solidni i mikropapilarni podtip najgoru prognozu.

Prema IASLC preporuci iz 2020. godine kombinacija predominantnog podtipa u zbroju s najgorim potipom ( $\geq 20$  % solidnog, mikropapilarnog, kribriiformnog ili složenoga glandularnog izgleda s fuziranim žljezdama ili pojedinačnim stanicama u dezmodoplastičnoj stromi) ima prediktivni značaj (16). U usporedbi s drugim modelima koji uzimaju u obzir mitotsku aktivnost, nuklearni i citološki gradus, STAS ili nekrozu, ova se shema pokazala boljim prediktorom za resecirani adenokarcinom pluća. U dobro diferencirane adenokarcinome spadaju predominantno lepidički podtip s  $< 20$  % najgorog podtipa. U umjereno diferencirane

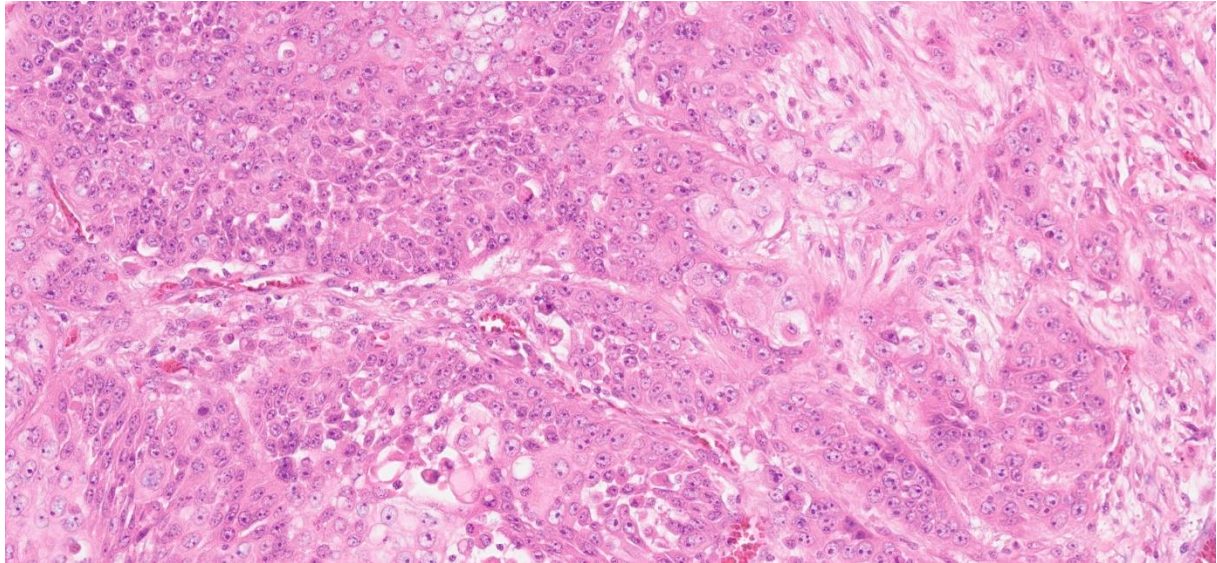
spada predominantno acinarni ili papilarni podtip s  $< 20\%$  podtipa najgoreg podtipa. U slabo diferencirane spadaju adenokarcinomi s  $\geq 20\%$  najgoreg podtipa.



Slika 3. Podtipovi adenokarcinoma pluća su A) lepidički, B) acinarni, C) solidni, D) papilarni i E) mikropapilarni podtip (HE, 400 x). Izvor: arhiva Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

#### 1.4.2. Planocelularni karcinom

Incidencija planocelularnog karcinoma posljednjih je desetljeća u padu, moguće zbog promijenjenih pušačkih navika. Tumor je obično smješten centralno u velikim dišnim putevima i može kavitirati. Histološki dobro diferencirane zloćudne pločaste epitelne stanice pokazuju karakteristično orožnjavanje i međustanične mostiće, a kad su slabo diferencirane, njihovo podrijetlo potvrđuje se imunohistokemijski jer izražavaju p40 i/ili CK5/6 biljeg (Slika 4.).



Slika 4. Planocelularni karcinom pluća, dobro diferenciran (HE, 200 x). Izvor: arhiva Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

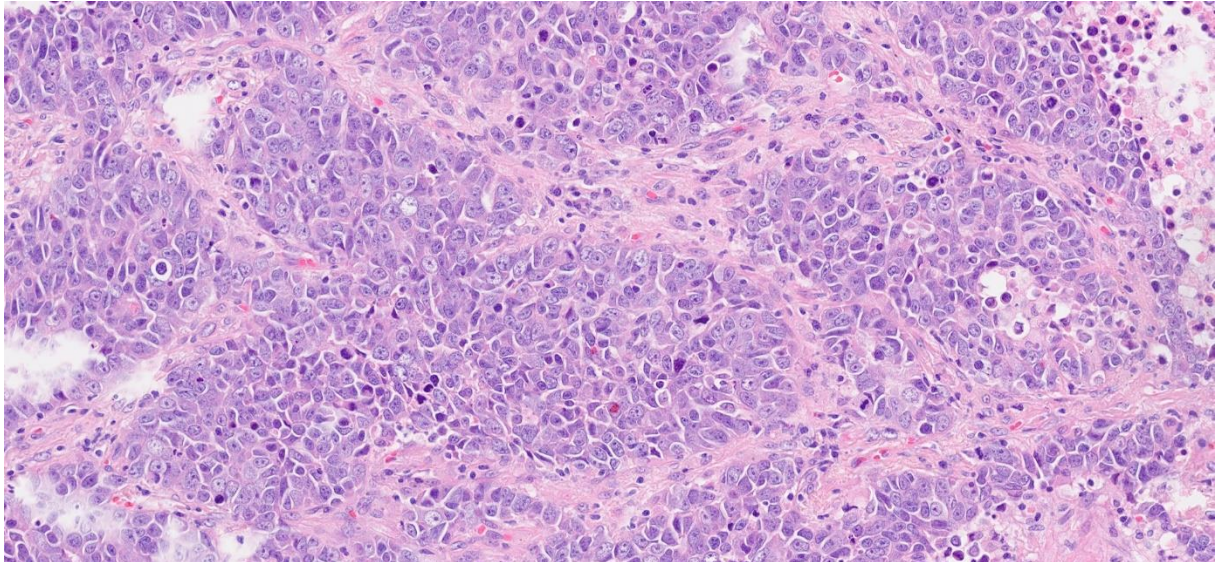
Podtipovi SCC-a – keratinizirajući, nekeratinizirajući i bazaloidni, nemaju značajnog utjecaja na prognozu. Opće preživljenje bolesnika s planocelularnim karcinomom ovisi o stanju bolesnika i stadiju bolesti u vrijeme dijagnoze. SCC se razvija stupnjevitom transformacijom i akumulacijom genetskih i epigenetskih alteracija. Mutacije, amplifikacije i delecije zahvaćaju *TP53*, *SOX2*, *PIK3CA*, *PTEN*, *RBI*, *CDKN2A*, *FGFR1* i mnoge druge gene, za koje zasada nema ciljane terapije (17).

#### 1.4.3. Karcinom velikih stanica

Karcinom velikih stanica ne pokazuje histološku ni imunohistokemijsku diferencijaciju adenokarcinoma, planocelularnog karcinoma ili neuroendokrinog karcinoma (“null” ili “nejasni” fenotip) (18). To su veliki, nekrotični, periferno smješteni tumori građeni od



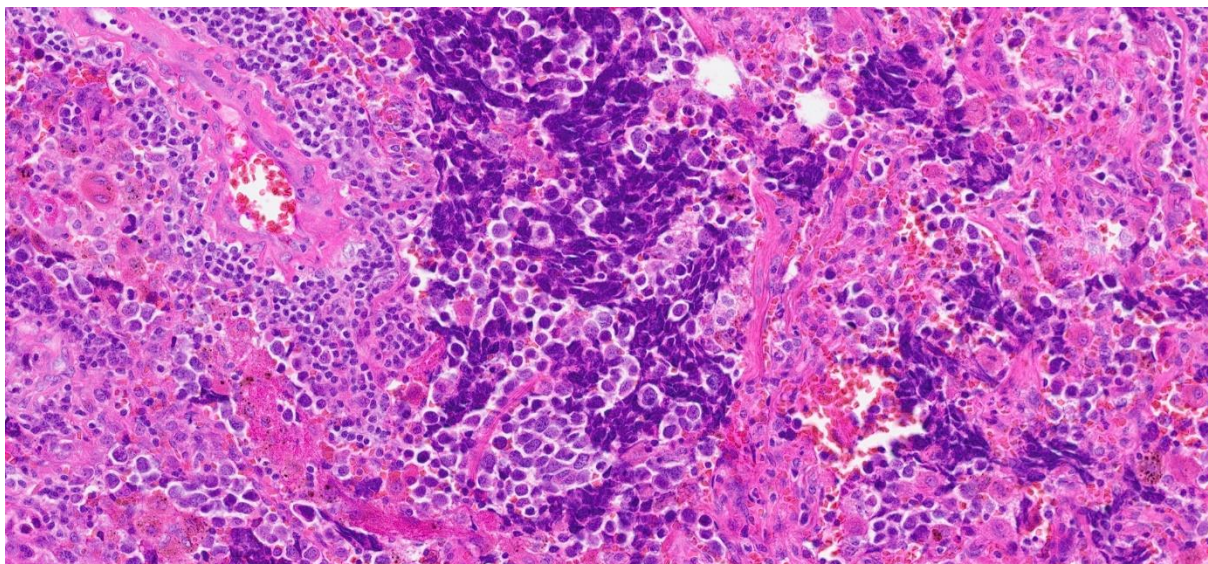
nediferenciranih epitelnih stanica uz koje se nalaze orijaške i vretenaste stanice ili pleomorfni karcinom (Slika 5.). Dijagnoza se postavlja samo na operativnom uzorku. Genomskom analizom mogu se naći mutacije kao u adenokarcinomu i izražaj gena vezanih uz epitelno-mezenhimalnu pretvorbu.



Slika 5. Karcinom velikih stanica (HE, 200 x). Izvor: arhiva Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

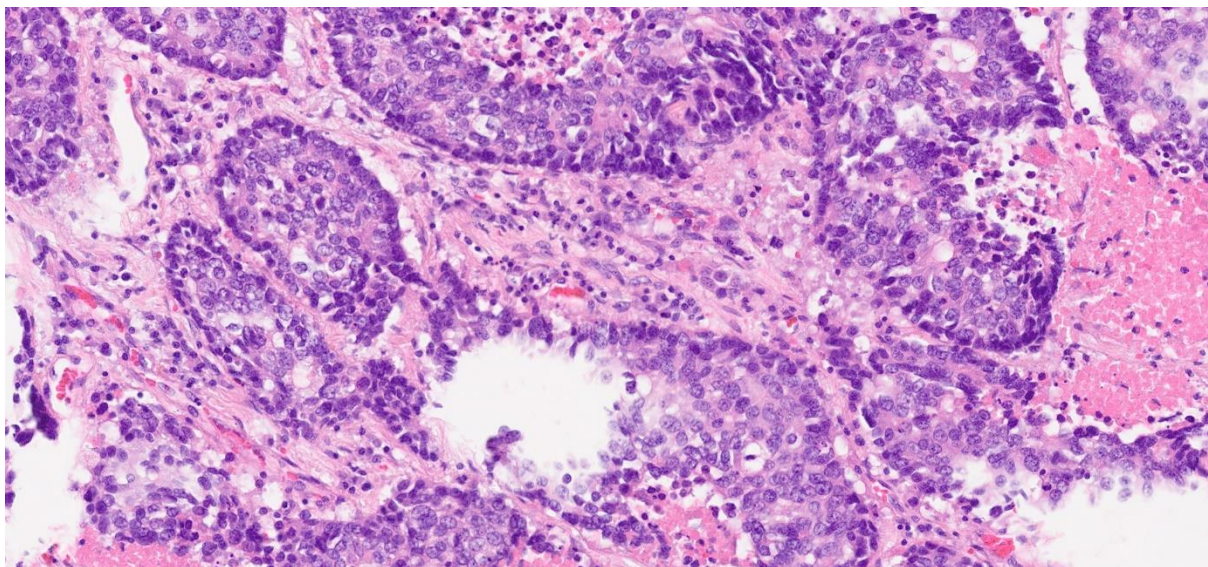
#### *1.4.4. Neuroendokrini karcinom malih stanica i velikih stanica*

Karcinom malih stanica (SCLC) jest neuroendokrini tumor pluća visokog stupnja malignosti (19). Većina oboljelih su pušači i u 60 % slučajeva imaju udaljene metastaze u trenutku dijagnoze. Tumor je najčešće lokaliziran centralno i izravno zahvaća hilarne limfne čvorove. Histološki je građen od nakupina zbijenih atipičnih epitelnih stanica (veličine tri mala limfocita) s oskudnom citoplazmom i hiperkromatskom jezgrom fino granuliranog kromatina bez jezgrice (Slika 6.). Nalazi se > 10 mitozna na 10 vidnih polja velikog povećanja (VPVP) i obilna nekroza. Većina SCLC-a izražava neuroendokrine biljege p56, kromogranin ili sinaptofizin, a proliferacijski indeks Ki-67 je visok, 65 – 100 %. Kombinirani SCLC ima dodatnu komponentu NSCLC-a, neuroendokrino karcinoma velikih stanica ili karcinoma vretenastih stanica. Genetskom analizom potvrđuje se bialelni gubitak funkcije *TP53* i *RB*, uz alteracije mnogih drugih gena.



Slika 6. Karcinom malih stanica (HE, 200 x). Izvor: arhiva Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

Neuroendokrini karcinom velikih stanica obično je periferno lokaliziran i klinički vrlo agresivan tumor. Histološki je građen od nakupina većih atipičnih epitelnih stanica s jezgričicom, ima žarišta nekroze i visoku mitotsku aktivnost ( $> 10$  mitozna na 10 VPVP-a) (Slika 7.) (20).



Slika 7. Neuroendokrini karcinom velikih stanica (HE, 200 x). Izvor: arhiva Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

## 1.5. TNM KLASIFIKACIJA KARCINOMA PLUĆA I STADIJI BOLESTI

U svijetu najčešće korištena klasifikacija za karcinom pluća jest TNM klasifikacija jer ona opisuje veličinu i stupanj proširenosti tumora i jedna je od odrednica za odluku o modalitetu liječenja. TNM sustav označava tumor (veličinu), limfne čvorove (prema anatomskoj podjeli) i prisutnost udaljenih metastaza (Tablica 1.). U praktičnoj je uporabi osmo izdanje TNM klasifikacije iz 2016. godine (21).

**Tablica 1.** TNM klasifikacija karcinoma pluća

Primarni tumor (T)	
<b>TX</b>	Primarni tumor ne može se procijeniti ili je tumor dokazan prisutnošću zloćudnih stanica u sputumu ili bronhalnom ispirku, ali se ne može otkriti radiološkim tehnikama ni bronhoskopijom.
<b>T0</b>	Nema dokaza o postojanju tumora.
<b>Tis</b>	Karcinom <i>in situ</i> .
<b>T1</b>	Tumor $\leq 3$ cm u najvećem promjeru, okružen plućima ili visceralnom pleurom, bez invazije proksimalnije od lobarnog bronha.
<b>T1a(mi)</b>	Minimalno invazivni karcinom.
<b>T1a</b>	Tumor $\leq 1$ cm u najvećem promjeru.
<b>T1b</b>	Tumor $> 1$ cm, ali $\leq 2$ cm u najvećem promjeru.
<b>T1c</b>	Tumor $> 2$ cm, ali $\leq 3$ cm u najvećem promjeru.
<b>T2</b>	Tumor $> 3$ cm, ali $\leq 5$ cm ili tumor s nekim od sljedećih obilježja: zahvaća glavni bronh neovisno o udaljenosti od karine, ali ne zahvaća karinu, ili invadira visceralnu pleuru, ili je udružen s atelektazom ili opstruktivnim pneumonitisom koji se širi u hilarnu regiju te zahvaća dio ili cijelo pluće.
<b>T2a</b>	Tumor $> 3$ cm, ali $\leq 4$ cm u najvećem promjeru.
<b>T2b</b>	Tumor $> 4$ cm, ali $\leq 5$ cm u najvećem promjeru.
<b>T3</b>	Tumor $> 5$ cm, ali $\leq 7$ 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.

<b>T4</b>	Tumor > 7 cm u najvećem promjeru ili prisutnost odvojenih tumorskih čvorova u različitom režnju ipsilateralnog pluća kao i primarni tumor ili tumor koji direktno zahvaća bilo koju od ovih struktura: ošit, medijastinum, srce, velike krvne žile, traheju, <i>nervus laryngeus recurrens</i> , jednjak, kralježnicu i karinu.
-----------	---

#### **Regionalni limfni čvorovi (N)**

<b>Nx</b>	Nepoznato.
<b>N0</b>	Bez presadnica u regionalne limfne čvorove.
<b>N1</b>	Presadnice u ipsilateralne peribronhalne i/ili ipsilateralne hilarne limfne čvorove i intrapulmonalne čvorove, uključujući i direktnu zahvaćenost.
<b>N2</b>	Presadnice u ipsilateralne medijastinalne i/ili supkarinalne limfne čvorove.
<b>N3</b>	Presadnice u kontralateralne medijastinalne, kontralateralne hilarne, ipsilateralne ili kontralateralne skalenske ili supraklavikularne limfne čvorove.

#### **Udaljene presadnice (M)**

<b>Mx</b>	Nepoznato.
<b>M0</b>	Bez udaljenih presadnica.
<b>M1</b>	Prisutne udaljene presadnice.
<b>M1a</b>	Odvojeni tumorski čvorovi u kontralateralnom pluću; tumor s pleuralnim ili perikardijalnim čvorovima ili maligni pleuralni ili perikardijalni izljev.
<b>M1b</b>	Jedna ekstratorakalna presadnica.
<b>M1c</b>	Multiple ekstratorakalne presadnice u jedan ili više organa.

Bolest se prema proširenosti dijeli u stadije (Tablica 2.) (21).

**Tablica 2.** Stadiji karcinoma pluća

Stadij bolesti	Primarni tumor (T)	Regionalni limfni čvorovi (N)	Udaljene metastaze (M)
Stadij I A1	T1a, T1a(mi)	N0	M0
Stadij I A2	T1b	N0	M0
Stadij I A3	T1c	N0	M0
Stadij I B	T2a	N0	M0
Stadij II A	T2b	N0	M0
Stadij II B	T1a, T1b, T1c	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadij III A	T1, T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
Stadij III B	T1a, T1b, T1c	N3	M0
	T2a, T2b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
Stadij III C	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
Stadij IV A	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a, M1b
Stadij IV B	Bilo koji T	Bilo koji N	M1c

## 1.6. LIJEČENJE KARCINOMA PLUĆA

### 1.6.1. Kirurško liječenje

Bolesnici s operabilnim karcinomom pluća (stadij bolesti I, II i dijelom III) podvrgavaju se kirurškom liječenju ako nemaju značajnijih komorbiditeta koji bi predstavljali anesteziološku kontraindikaciju za operacijski zahvat (22). U bolesnika sa stadijem IIIa koji su liječeni neoadjuvantno moguće je kirurško liječenje ako se radiološki dokaže samo jedna pozitivna razina medijastinalnih limfnih čvorova. Zlatni standard u kirurškom liječenju raka pluća jest lobektomija i medijastinalna limfadenektomija, koje se danas uglavnom izvode minimalno invazivnom kirurgijom s pomoću videotorakoskopije (VATS od engl. *video-assisted thoracoscopic surgery*) (23). Plućni režanj zahvaćen tumorom uklanja se lobektomijom, rjeđe bilobektomijom ili pulmektomijom. Limfni čvorovi uklanjaju se sistemskom nodalnom disekcijom medijastinalne masti s limfnim čvorovima i hilarnih limfnih čvorova ili režanj-specifičnom sustavnom nodalnom disekcijom koja uključuje medijastinalne drenažne čvorove prema primarnoj lokaciji tumora. Potrebno je ekstirpirati najmanje šest limfnih čvorova iz šest razina, od kojih su tri medijastinalne.

U slučaju VATS lobektomije bolesnika treba postaviti u lateralni dekubitalni položaj, nakon čega anesteziolog uspostavlja jednostranu plućnu ventilaciju. Kirurg pristupa u prsište kroz jednu ili više malih incizija bez širenja rebara i interkostalnih prostora. Zahvat se izvodi korištenjem kutne kamere i posebnog instrumentarija za minimalno invazivnu torakoskopsku kirurgiju. Kirurg tupom ili oštrom disekcijom ispreparira strukture plućnog hilusa i interlobarnih fisura i uporabom endostaplera, mehaničkih šivača i rezača na dršci, selektivno presječe lobarne strukture (lobarnu venu, arterijske ogranke i bronh) te konačno odstrani plućni režanj. Zahvat je kompletan nakon što se uradi medijastinalna limfadenektomija, koju neki operateri preferiraju uraditi prije lobektomije. Preparati pluća i limfnih čvorova označe se po regijama i u odvojenim posudama pošalju na patohistološku analizu (24).

Nakon operacije karcinoma pluća određuje se pTNM stadij bolesti i prognostička skupina te donosi odluka o kliničkom praćenju i/ili adjuvantnoj onkološkoj terapiji. Mikroskopski nalaz pozitivnih medijastinalnih limfnih čvorova nezavisni je negativni prognostički čimbenik, pa je optimalno urađena medijastinalna limfadenektomija bitna za daljnje liječenje i prognozu bolesnika (25). Patološki TNM stadij ne poklapa se uvijek s prijeoperacijskim slikovnim procjenama i kliničkim stadijem bolesti. Stoga bi pravovremena informacija o biološki agresivnijem tumoru, donesena na temelju patohistološke analize u

bioptičkom uzorku, mogla kirurga usmjeriti na što temeljitiju medijastinalnu limfadenektomiju, kako bi se utvrdila nodalna bolest.

Perioperacijske komplikacije su produljeno istjecanje zraka kroz torakalni dren, atelektaza, aritmije, krvarenje, upala pluća, pleuralni izljev, infekcije rane, tromboembolijski incidenti, a kasne komplikacije pleuralni empijem i bronhopleuralna fistula. Operacija produljuje život bolesnika s NSCLC-om. Ako nema ranih poslijeoperacijskih komplikacija, moguće je višegodišnje preživljenje i ponekad izlječenje.

### **1.6.2. Onkološko liječenje i radioterapija**

Ako je zbog anesteziološke kontraindikacije bolesnik u stadiju bolesti I ili II neoperabilan, u obzir dolazi radikalna radioterapija tumora (60-70 Gy/2 Gy po frakciji, a za I. stadij stereotaksijska radioterapija) (22, 26).

U bolesnika s IIIA stadijem bolesti preporučuje se provođenje neoadjuvantne kemoterapije prije potencijalnoga kirurškog zahvata (do četiri ciklusa kemoterapije temeljene na platini) ili neoadjuvantne kemoradioterapije. Ako bolesnik nije kandidat za kirurško liječenje, indicirana je primarna konkomitantna kemoradioterapija (60-70 Gy/2 Gy po frakciji uz kemoterapiju temeljenu na platini). U bolesnika koji ima značajne komorbiditete u obzir dolazi sekvencijska kemoterapija pa radioterapija. Bolesnike u stadiju bolesti IIIB treba liječiti konkomitantnom kemoradioterapijom. Poslijeoperacijska radioterapija indicirana je u nekoliko slučajeva: kod neradikalno operiranih bolesnika s N0 i N1 bolesti ako reoperacija nije moguća, kod dijela bolesnika s radikalno operiranom N2 bolesti i neradikalno operiranih bolesnika s N2 bolesti. Prema najnovijim NCCN smjernicama (*engl. National Comprehensive Cancer Network*), adjuvantna kemoterapija nakon kirurškog liječenja potrebna je za bolesnike sa stadijem bolesti IB (T2a, N0) i stadijem IIA (T2b, N0) ukoliko postoje visokorizični čimbenici (visoki gradus, limfovaskularna invazija, invazija visceralne pleure), te kod stadija IIB-IIIB (26).

Najvažniji citostatik u liječenju bolesnika s rakom pluća je cisplatin (tjeđe karboplatin) kombiniran s još jednim od sljedećih citostatika: pemetreksed (samo za bolesnike s neskvamoznim NSCLC-om), gemcitabin, docetaksel, paklitaksel, vinorelbin ili etopozid. Bolesnici sa stadijem bolesti IV do prije 15-ak godina liječeni su samo kemoterapijom, uz skromne ishode liječenja i s medijanom ukupnog preživljenja od oko deset mjeseci. Posljednjih godina svjedoci smo značajnog napretka u liječenju bolesnika s uznapredovalim NSCLC-om

na dvama različitim poljima: na polju ciljane terapije i imunoterapije inhibitorima kontrolnih točaka.

Ciljana terapija značajno je poboljšala ishode liječenja bolesnika koji imaju targetabilne genske alteracije (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *MET*, *RET*, *BRAF*, *HER 2*, *KRAS* i *NTRK*). Ako se u bolesnika s diseminiranim NSCLC-om utvrdi postojanje jedne od tih genskih alteracija, oni se liječe malim molekulama koje karakterizira bolja učinkovitost i povoljniji toksični profil u usporedbi s kemoterapijom. *EGFR* mutacije nalaze se u 10 – 15 % bolesnika s NSCLC-om (učestalost je veća kod Azijaca, žena, nepušača, bolesnika s adenokarcinomom). Terapijski su na raspolaganju tri generacije EGFR TKI: erlotinib, gefitinib (prva generacija), afatinib (druga generacija) i osimertinib (treća generacija). Treba istaknuti da je terapija osimertinibom poboljšala preživljenje bolesnika s diseminiranim NSCLC-om, kao i bolesnika s ranim resektabilnim NSCLC-om kroz adjuvantno liječenje, neovisno o tome jesu li primili i adjuvantnu kemoterapiju. *ALK* translokacija dijagnosticira se u 3 – 5 % bolesnika s NSCLC-om, a u liječenju se koriste tri generacije ALK TKI: krizotinib (prva generacija), alektinib, brigatinib (druga generacija) i lorlatinib (treća generacija). U liječenju bolesnika s ROS1 pozitivnim NSCLC-om (1 – 2 % bolesnika s NSCLC-om) na raspolaganju su TKI krizotinib i entrectinib.

Drugi važan napredak u liječenju bolesnika s NSCLC-om dogodio se na području imunoterapije inhibitorima kontrolnih točaka. Osim testiranja ADC-a na genske alteracije, svim bolesnicima s NSCLC-om treba refleksno testirati izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama. Oko 30 % bolesnika s NSCLC-om ima izražaj PD-L1 u 50 % ili više tumorskih stanica, 40 % bolesnika u 1 – 49 % tumorskih stanica, a 30 % bolesnika ima izražaj PD-L1 u manje od 1 % tumorskih stanica.

Bolesnici s diseminiranim NSCLC-om, neovisno o histološkom podtipu, a koji nemaju targetabilne genske alteracije, dobrog su općeg stanja (ECOG 0 ili 1) i bez kontraindikacija za imunoterapiju, u prvoj liniji liječenja trebaju primiti imunoterapiju inhibitorom kontrolnih točaka. Bolesnici s izražajem PD-L1 u 50 % ili više tumorskih stanica u prvoj se liniji najčešće liječe samo imunoterapijom. Bolesnici s izražajem PD-L1 na 1 – 49 % tumorskih stanica i bolesnici s izražajem PD-L1 u manje od 1 % tumorskih stanica u prvoj se liniji liječe kombinacijom kemoterapije i imunoterapije inhibitorima kontrolnih točaka. U Hrvatskoj su na raspolaganju pembrolizumab i nivolumab (PD-1 protutijela) te atezolizumab i durvalumab (PD-L1 protutijela). U usporedbi s nekim TKI i kemoterapijom, imunomodulacijska terapija metastatskog NSCLC-a PD-1 i PD-L1 inhibitorima ima dugotrajan dobar odgovor u podskupini bolesnika.



Palijativna radioterapija primjenjuje se za smanjenje simptoma bolesti i poboljšanje kvalitete života bolesnika s uznapredovalom bolesti. Najčešće je indicirana kod moždanih ili koštanih metastaza i sindroma gornje šuplje vene. Naposljetku, kod svih bolesnika s uznapredovalim karcinomom pluća savjetuje se što prije otpočeti suportivnu terapiju.

## **1.7. IMP3 I AGRESIVNOST TUMORA**

Duže se vrijeme kao potencijalni biljeg agresivnosti i većeg metastatskog potencijala humanih tumora istražuje IMP3 (protein 3 vezan na mRNA inzulinu sličnog čimbenika rasta 2), u literaturi još spominjan kao KOC (engl. K homology domain containing protein over-expressed in cancer), IGF2BP3 ili L523S (39). Gen za IMP3 lociran je na kromosomu 7p11.2.6. IMP3 ima 500 aminokiselina, dva motiva za prepoznavanje RNA i 4 K homologne domene, a kontrolira prepisivanje IGF-2 mRNA. Fiziološki je IMP3 jako izražen u embrionalnom tkivu i intermedijarnom trofoblastu posteljice i tada članovi IMP obitelji, IMP1, IMP2 i IMP3, imaju ključnu ulogu u prometu i stabilizaciji RNA, staničnom rastu i migraciji. Patološki je IMP3 izražen u mnogim zloćudnim tumorima (40) pa tako i u karcinomu pluća (41). Izražaj IMP3 u karcinomu pluća povezan je sa solidnim podtipom adenokarcinoma pluća (42) i s prisutnošću udaljenih metastaza (43).

Prema istraživanju Vikesea i suradnika IMP3 stabilizira CD44 mRNA, promovira staničnu adheziju i oblikovanje invadopodija, što pokazuje njegovu ulogu u staničnoj migraciji i invaziji tijekom nastanka karcinoma. Autori spominju da je izražaj IMP3 u tumoru povezan s 395 gena uključenih u stanični ciklus i proliferaciju. U kulturi stanica karcinoma pluća izraženi IMP3 pospješuje proliferaciju, migraciju i invaziju tumorskih stanica in vitro i in vivo, a prigušenje tog gena ima suprotan učinak. IMP3 djeluje na mRNA ciljnih proteina myc, MMP9, SLUG, cikline i druge, koja se tim vezanjem stabilizira i tako modulira transkriptnu razinu svojih gena (44). Kada je IMP3 direktno udružen s enzimom deubikvitinazom USP10, umanjuje njezinu ulogu u stabiliziranju p53 (45). Na taj način IMP3 djeluje kao ključni modulator transkripcije i posttranslacijski modulator u razvoju raka. Nadalje, koekspresija IMP3 i VEGF-A pojačava tumorsku angiogenezu i povezana je s lošijim preživljenjem bolesnika s NSCLC-om (46).

Standardizirani operativni patološki nalaz daje informaciju o histološkom tipu karcinoma pluća, invazivnosti karcinoma i patološkom TNM stadiju. Iako je operacijom tumor najčešće uklonjen, s vremenom većina bolesnika s NSCLC-om umire zbog udaljenih metastaza (22). Zato bi za kliničko praćenje operiranih bolesnika bila korisna informacija o agresivnosti i

udaljenom metastatskom potencijalu tumorskih stanica, primjerice s biljegom IMP3 testiranim na primarnom tumoru i nodalnoj metastazi.

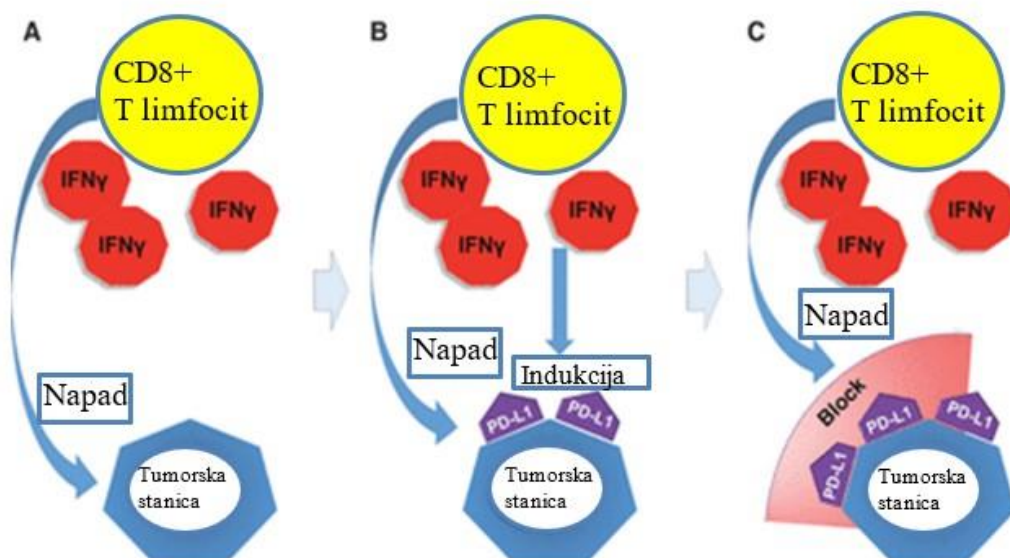
## 1.8. INHIBICIJSKI RECEPTORI I NJIHOVI LIGANDI

Posljednjih godina imunoterapija je postala nova paradigma u liječenju metastatskih tumora, a temelji se na deblokadi imunološkog sustava kako bi mogao specifično reagirati na tumor (27). Imune stanice imaju kostimulacijske receptore sa zajedničkim motivom ITAM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) i koinhibicijske receptore s motivom ITIM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), a oba receptora reagiraju s tirozin kinazom preko SH2 domene (engl. *src homology 2 domain*). Koinhibicijski receptori mogu stvarati dimere s odgovarajućim kostimulacijskim receptorom i tako inhibirati aktivacijske imune signale, pa se nazivaju inhibicijskim receptorima (iR). Iako su inhibicijski receptori prvo bili otkriveni na prirodno ubilačkim stanicama (engl. *natural killer* – NK), najbolje su istraženi u T-limfocitima, osobito PD-1 i CTLA-4. PD-1 ima opisan ITIM motiv, a CTLA-4 i naknadno otkriveni LAG-3 imaju alternativne motive. Inhibicijski receptori negativno utječu na funkciju i aktivaciju T-limfocita jer se natječu s kostimulacijskim receptorima za ligand ili ometaju stvaranje mikroklastera i lipidnih splavi, interferiraju s nizvodnim signalima koaktivacijskog i T-staničnog receptora te potiču prepisivanje gena uključenih u disfunkciju T-limfocita (27).

Inhibicijski receptori su molekule imunološke kontrolne točke čija je funkcija sprječavanje pretjeranog imunog odgovora u kroničnoj upali, koji bi mogao izazvati autodestruktivno oštećenje tkiva. Izražaj iR-a ovisi o T-staničnoj aktivaciji i diferencijaciji. Naivne, efektorske i memorijske T-stanice u zdravom tkivu imaju prirodno različit profil iR-a, čiji se izražaj pojačava aktivacijom stanice (28). U kroničnoj infekciji i tumorskom mikrookolišu T-limfociti su stalno izloženi antigenima i to dovodi do prigušenja njihove aktivnosti kako bi se ograničilo oštećenje tkiva. Iscrpljenje T-limfocita istraženo je u mišjem modelu inficiranome virusom limfocitnog koriomeningitisa (engl. *lymphocytic choriomeningitis virus* – LCMV) (29). U akutnoj infekciji efektorni T-limfociti normalno postaju memorijske stanice čim se ukloni patogen. Nasuprot tomu, u kroničnoj infekciji trajna antigenska stimulacija dovodi do progresivnog gubitka učinkovitosti CD8 T-stanica, to jest do T-staničnog iscrpljenja. Fenomen staničnog iscrpljenja CD8 stanica može se pratiti kroz njihov izražaj inhibicijskih receptora: PD-1, CTLA-4, TIM3, LAG-3, CD160, BTLA i 2B4 u različitim kombinacijama.

U mišjem LCMV modelu i humanim bolestima kao što su kronične infekcije, autoimune bolesti i različiti tumori nalaze se CD8 T-limfociti s izraženim iR-om. CD8 T-limfociti u metastatskom melanomu imaju više iR-a nego CD8 T-limfociti u krvotoku i manje su funkcionalni (30). Slično kroničnoj virusnoj infekciji, u tumorskom mikrookolišu iscrpljenje T-limfocita nastaje zbog stalne antigenske stimulacije pretežno vlastitim antigenima. Prema Baitschu tri su prepreke protutumorskoj aktivnosti T-stanica: malen broj T-stanica i repertoar njihovih receptora koji imaju afinitet za vlastite/tumorske stanice, slaba antigenost tumorskih stanica i iscrpljenost T-stanica u tumoru inhibicijskim signalima od drugih imunih stanica, strome i tumorskih stanica (31).

Zloćudne stanice različitih tumora u određenom postotku slučajeva izražavaju ligand za PD-1, tzv. PD-L1 (engl. *programmed death ligand-1*), koji spajanjem s PD-1 inhibira djelovanje specifičnih citotoksičnih T-limfocita. PD-L1 je u tim tumorskim stanicama izražen zbog somatske mutacije ili je induciran preko  $\gamma$ -interferonskog puta (32, 33). PD-L1 je povezan s imunim mikrookolišem koji obiluje CD8 T-stanicama, Th1 citokinima i interferonom gama (IFN- $\gamma$ ), koji kao citokin kontradiktorno pojačava izražaj PD-L1 odgovoran za progresiju tumora (Slika 8.).



Slika 8. PD-L1 na tumorskim stanicama (35) – adaptivni imuni mehanizam za izbjegavanje imunog odgovora. A) citotoksični T-limfociti izlučuju IFN- $\gamma$  koji B) inducira PD-L1 na membrani tumorske stanice i tako C) blokira specifično protutumorsko djelovanje specifičnoga citotoksičnog T-limfocita. Izvor: Mandai M i sur. *Dual Faces of IFN $\gamma$  in Cancer*

*Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. Clin Cancer Res. 2016;22: 2329–34.*

Izražaj PD-L1 u tumoru je heterogen i nije ograničen na tumorske stanice, već se može naći na makrofagima i T-limfocitima, a mijenja se s vremenom i primijenjenom terapijom. Mallet i sur. ustanovili su djelovanje PD-L1 ne samo na T-stanice nego i na monocite, dendritičke i NK-stanice kojima modulira razvoj, funkciju i izražaj PD-1 (34).

Izražaj PD-L1 nađen je, među ostalim, u NSCLC-u (36). Prema literaturi, izražaj PD-L1 pod utjecajem je unutarnjih bioloških i genetskih zbivanja uključenih u imunogenična svojstva tumora. Uz to, generiranje neoantigena i vrijeme “prirodne imunološke povijesti” jako se individualno razlikuju i utječu na izražaj PD-L1 (37).

Zbog imunoterapije blokatorima kontrolne točke analiza PD-L1 statusa (0 %, 1 – 49 %,  $\geq 50$  %) u tumorskim stanicama postala je sastavni dio refleksnog testiranja na bioptičkim uzorcima novodijagnosticiranoga NSCLC-a (38). Bolesnicima s NSCLC-om primjenjuje se u prvoj liniji blokator PD-1 ili PD-L1 (ako je izražaj PD-L1  $\geq 50$  % zloćudnih stanica), ili u kombinaciji s terapijom temeljenom na platini (ako je izražaj PD-L1  $< 50$  %). To su humanizirana protutijela IgG4 razreda koja se daju u intravenskoj infuziji. Za otkriće liječenja raka suprimiranjem negativne imunomodulacije znanstvenici James Allison i Tasaku Honjo dobili su Nobelovu nagradu 2018. godine. Oni su utvrdili da PD-1 odnosno CTLA-4 imaju ulogu kočničara u imunnoj funkciji; imunosna inhibicija tih kontrolnih točaka reaktivira T-stanice da mnogo učinkovitije uklanjaju stanice raka.

## **2. HIPOTEZE I CILJEVI**

## **HIPOTEZE:**

1. Pozitivni izražaj IMP3 značajno je povezan s lokalnim metastaziranjem u regionalne limfne čvorove.
2. Imuni odgovor u mikrookolišu tumora, koji može biti odsutan, slab ili jak (nalik upali), značajno je povezan s izražajem PD-L1 u tumorskim stanicama.

## **CILJEVI ISTRAŽIVANJA:**

1. usporediti izražaj IMP3 u tumoru sa statusom limfnih čvorova i sa svim praćenim pokazateljima
2. usporediti izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama s imunim odgovorom u tumorskom mikrookolišu
3. usporediti izražaj PD-L1 po histološkom tipu karcinoma, podtipu adenokarcinoma i drugim patološkim pokazateljima
4. istražiti povezanost svih praćenih pokazatelja s općim preživljenjem i vremenom bez povrata bolesti.

### **3. MATERIJALI I POSTUPCI**

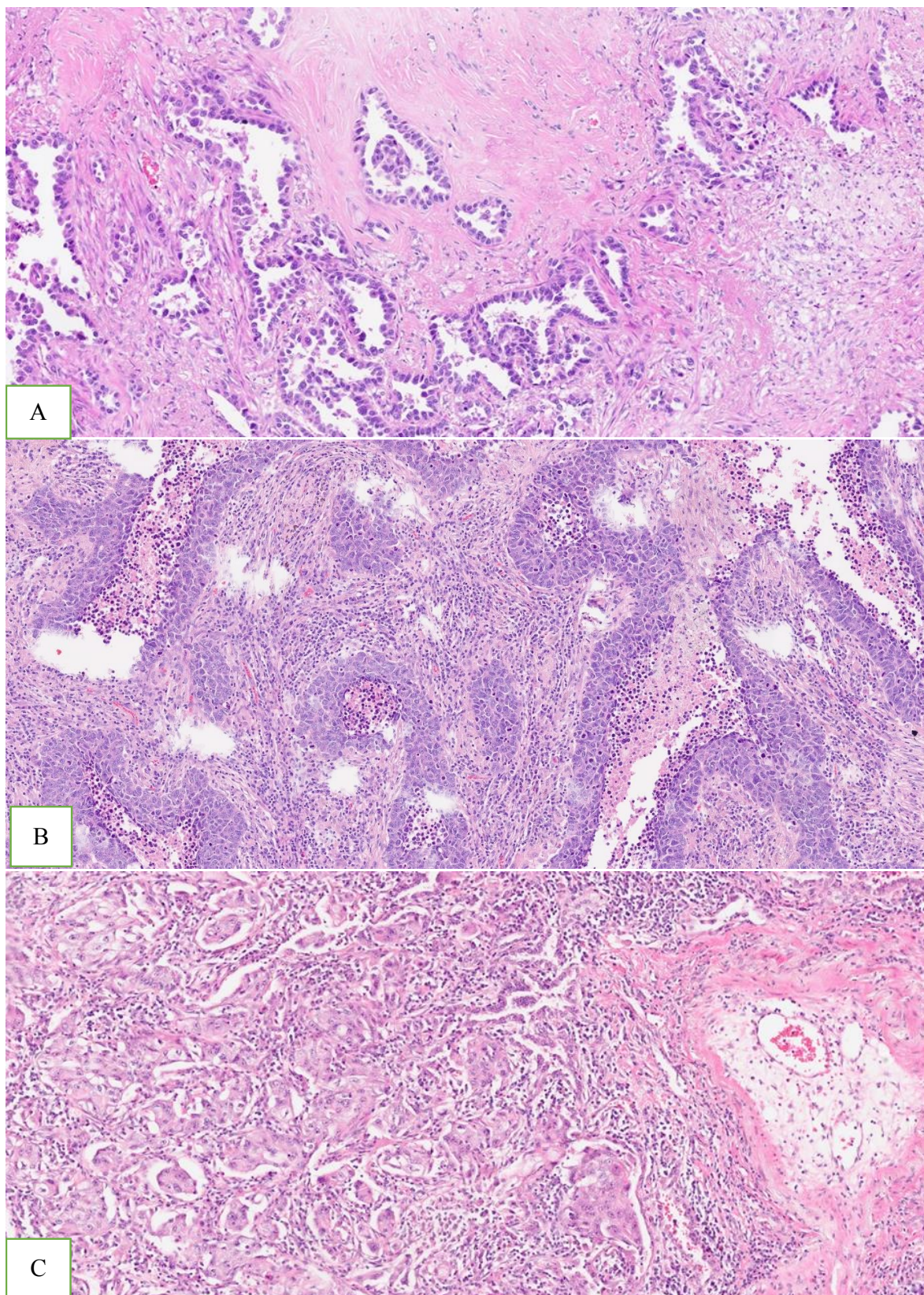
### 3.1. Ispitanici

U studiju je uključeno 108 ispitanika koji su operirani zbog NSCLC-a na Klinici za kirurgiju KBC-a Split, čiji je operativni materijal analiziran na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split od 1. siječnja 2012. do 31. prosinca 2018. godine. Kriteriji uključanja bili su dijagnoza NSCLC-a i urađena lobektomija s limfadenektomijom te cjeloviti klinički podatci. Iz studije su isključeni bolesnici s drugim histološkim tipovima karcinoma pluća, oni kojima je urađena sublobarna resekcija pluća ili nisu imali kliničko praćenje.

Opće preživljenje izračunano je u mjesecima od datuma biopsije tumora do datuma smrtnog ishoda, ili zaključno s posljednjim danom praćenja 1. siječnja 2019. godine, kada je određen status ispitanika (živ/mrtav). Medijan praćenja bio je 25,5 (min-max: 1-84) mjeseci. Vrijeme bez povrata bolesti izraženo u mjesecima izračunano je od datuma operacije do potvrde recidiva/udaljene metastaze kliničkom ili slikovnom metodom. Ulazne varijable bile su dob (godine), spol (muško/žensko), tip karcinoma (ADC/SCC/NSCLC-NOS), podtip adenokarcinoma pluća (1 – lepidički, 2 – acinarni, 3 – papilarni, 4 – solidni, 5 – mikropapilarni), stupanj diferencijacije, tj. gradus tumora (1-2-3), limfovaskularna invazija (ne/da), veličina tumora (cm), zahvaćenost limfnih čvorova (ne/da), TNM (I – II – III), izražaj PD-L1 ( $0 \leq i \leq 1$ ), imuni odgovor u mikrookolišu (odsutan/slab/jak), IMP3 (H-skor i medijan 0-3), vrijeme praćenja ispitanika (mjeseci) i status bolesnika na kraju praćenja (živ/mrtav).

Imuni odgovor u tumorskom mikrookolišu analiziran je na pet vidnih polja velikog povećanja i vrednovan kao I) odsutan – dezmostoplastična stroma bez mononuklearnog infiltrata (engl. “*desert*”), II) slab – frontalni mononuklearni infiltrat (engl. “*brisk*”) te III) jak – gusti mononuklearni infiltrat koji prožima tumorsko tkivo (engl. “*inflammatory-like*”) (Slika 9.). U infiltratu većinu stanica čine CD8+ T-limfociti.





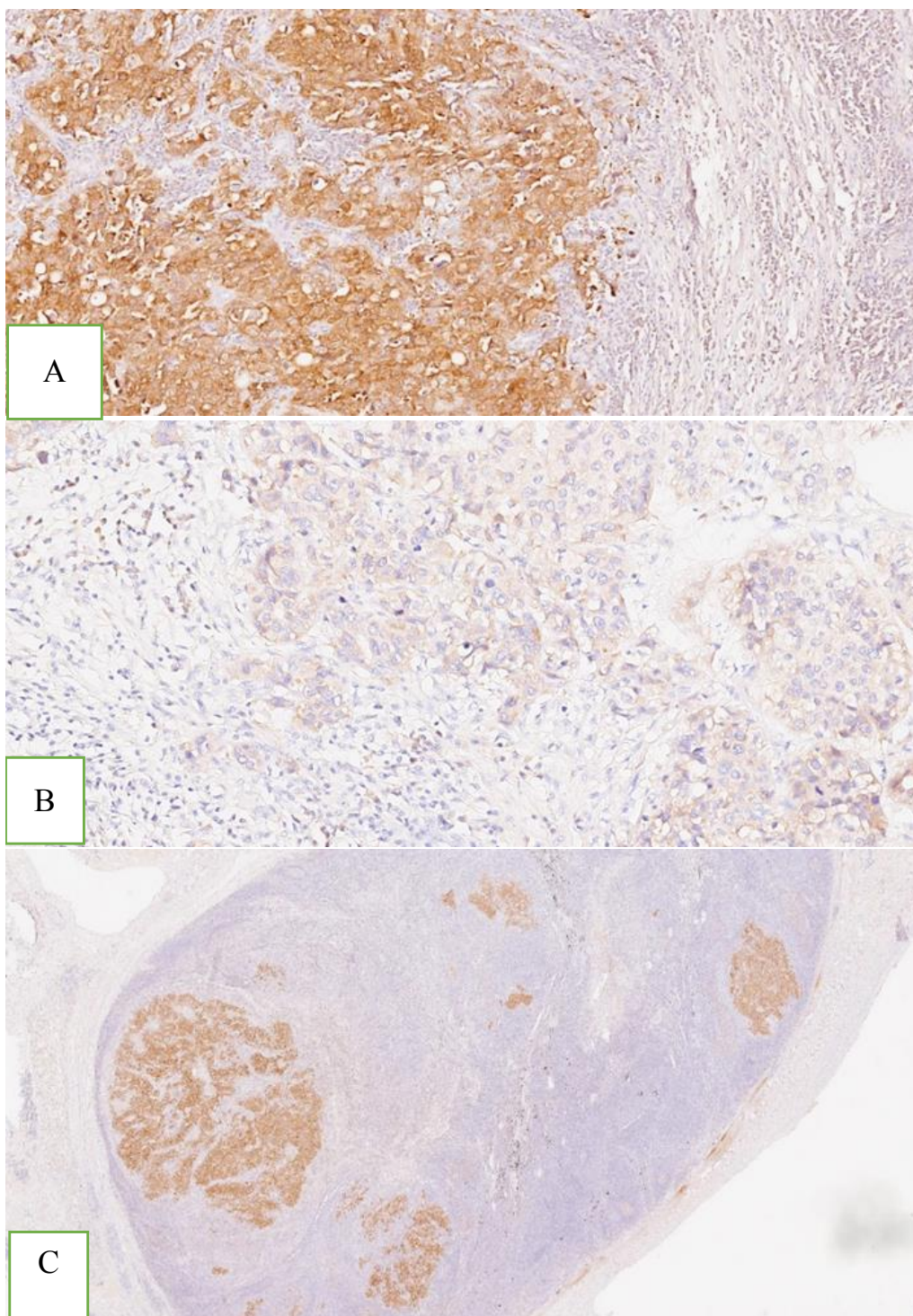
Slika 9. Različiti tipovi tumorskog imunog mikrookoliša: A) odsutan, B) slab i C) jak, sličan upali (HE, 200 x). Izvor: arhiva Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

Glavni izlazni pokazatelji bili su opće preživljenje odnosno vrijeme bez povrata bolesti, izraženi u mjesecima, koji su uspoređeni prema svim ulaznim varijablama.

### **3.2. Postupci**

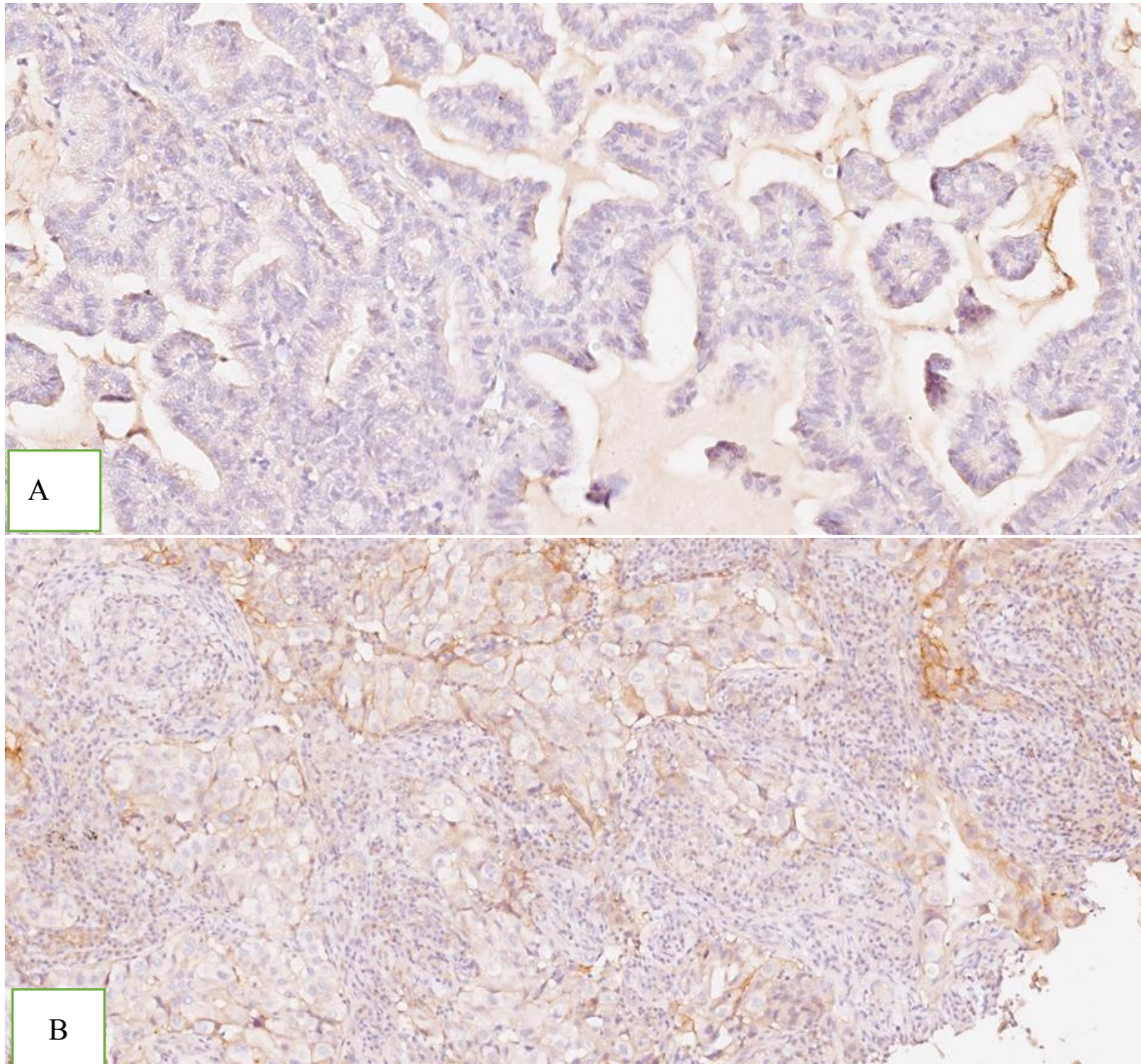
Bojenje preparata indirektnom imunohistokemijskom metodom urađeno je u Laboratoriju za imunohistokemiju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju u automatskom bojaču Ventana Ultra BenchMark (Ventana, Tuscon, Arizona). Svi originalni preparati i imunohistokemijska bojenja analizirani su na mikroskopu Olympus 51BX (Olympus, Tokyo, Japan).

Iz parafinskih blokova tumorskog tkiva dobivenoga operacijskim liječenjem izrezani su preparati debljine 4  $\mu\text{m}$  i inkubirani s monoklonskim mišjim protutijelom na IMP3 (klon 69.1, DAKO, Glostrup, Danska) u razrjeđenju 1:50. Imunoreakcija je vizualizirana pomoću iView DAB detekcijskog kita (Ventana, Tuscon, Arizona). Pozitivan izražaj IMP3 jest smeđe bojenje citoplazme. Pozitivna vanjska kontrola za IMP3 bio je intermedijarni trofoblast posteljice (Slika 10.). Mikroskopskom analizom procijenjen je udio IMP3 pozitivnih zloćudnih stanica i izražen kao proporcijski skor (0 za 0 %, 0,1 za 1 – 9 %, 0,5 za 10 – 49 % i 1,0 za  $\geq 50$  %). Intenzitet obojenja jezgre stupnjevan je od 0 do 3. Umnoškom proporcijskog skora i intenziteta obojenja dobiven je semikvantitativni H-skor.



Slika 10. Izražaj IMP3 u tumorskim stanicama adenokarcinoma pluća. Jako, odnosno slabo izražen u primarnom tumoru (A i B) i jako izražen (C) u nodalnom metastatskom tumoru (IMP3/HRP, A i B 400 x, C 200 x). Izvor: arhiva Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

Imunohistokemijskim bojenjem analiziran je PD-L1. Korišteno je mišje monoklonsko protutijelo na PD-L1, spremno za uporabu (klon 22C3, DAKO, Glostrup, Danska) (33). Pozitivan izražaj PD-L1 bio je smeđe obojenje membrane zloćudnih stanica (Slika 11.). Pozitivna vanjska kontrola za PD-L1 bio je trofoblast posteljice. Mikroskopskom analizom kvantitativno je procijenjen postotak (%) pozitivnih tumorskih stanica u odnosu na sve tumorske stanice.



Slika 11. Izražaj PD-L1 u adenokarcinomu pluća: A) negativan i B) pozitivan membranski izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama (PD-L1/HRP, 400 x). Izvor: arhiva Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

### **3.3. Statistička analiza**

Prikupljeni podatci uneseni su u program Microsoft Exel za Windows 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD), a za izračun statističke značajnosti korišten je program Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software (verzija 20 za Windows; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Rezultati su prikazani tablično i grafički, a interpretirani na razini značajnosti  $P < 0,05$ . Za analizu kvantitativnih varijabla korišten je Kruskal-Wallisov test i Mann-Whitneyjev test. Coxovom regresijskom analizom ispitana je povezanost svih istraživanih varijabla s dužinom preživljenja bolesnika u mjesecima. U analizi preživljenja prema svim varijablama korištena je Kaplan-Meierova krivulja preživljenja i log-rank test.

### **3.4. Etička načela**

Disertacija je sukladna sa svim primjenjivim svjetskim smjericama i preporukama, čiji je cilj osigurati pravilno ophođenje i rukovanje biološkim materijalima. Svi prikupljeni podatci korišteni su isključivo u istraživačke svrhe, bez navođenja bilo kakvih osobnih ili drugih podataka o bolesnicima. Istraživanje je odbreno od Etičkog povjerenstva Kliničkoga bolničkog centra Split (ur. br.: 500-03/18-01/18) i provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

#### **4. REZULTATI**

Ukupno je 108 ispitanika. Demografski i kliničko-patološki podaci prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Broj (%) ispitanika prema kvalitativnim varijablama i medijani (Q1-Q3; min-max) kvantitativnih varijabla koje su istraživane u studiji

Varijabla	N (%)
Spol	
Muškarci	76 (70)
Žene	32 (30)
Dob (godina)	66 (60 – 71; 45 – 84)
Stadij	
I	50 (47,2)
II	31 (29,2)
III	25 (23,6)
Histološki tip	
Adenokarcinom	68 (63)
Planocelularni	35 (32)
Metastaze u limfne čvorove ukupno	
Hilarni (N1)	18 (17)
Medijastinalni (N2)	20 (19)
Limfovaskularna invazija	
Prisutna	61 (57)
Nije prisutna	47 (43)
Tip imunog odgovora	
Odsutan	49 (45,4)
Slab	39 (36,1)
Jak	20 (18,5)
Gradus	
1	15 (14)
2	59 (56)
3	32 (30)
PD-L1	
Negativan	61 (56)
Pozitivan	47 (44)
IMP3	
Negativan	60 (57)
Pozitivan	48 (43)

Analiza izražaja IMP3 s obzirom na praćene varijable prikazana je u Tablici 4.

**Tablica 4.** Prikaz medijana (Q1-Q3; min-max) izražaja IMP3 u primarnom tumoru u odnosu na ispitivane patohistološke varijable

Varijabla		Medijan IMP3 (Q1-Q3; min-max)	p
Histološki tip	adenokarcinom	0 (0-40; 0-300)	0,059*
	planocelularni	12,5 (0-50; 0-250)	
Limfovaskularna invazija	nije prisutna	0 (0-42; 0-300)	0,637*
	prisutna	0 (0-50; 0-300)	
Status limfnih ćvorova	negativan	0 (0-0; 0-200)	0,040*
	pozitivan	10 (0-106; 0-300)	
Patološki stadij bolesti	1	0 (0-30; 0-200)	0,196**
	2	5 (0-60; 0-300)	
	3	0 (0-62; 0-300)	
Imuni odgovor	odsutan	0 (0-40; 0-200)	0,164**
	slab	5 (0-110; 0-250)	
	jak	0 (0-5; 0-300)	
Gradus	1	40 (0-122; 0-300)	0,100**
	2	0 (0-50; 0-250)	
	3	0 (0-8,7; 0-200)	
Podtip adenokarcinoma	acinarni	0 (0-50; 0-300)	0,068**
	papilarni	0 (0-0; 0-120)	
	solidni	7,5 (0-79; 0-200)	

\*Mann-Whitneyje U-test, \*\*Kruskal-Wallisov test

Medijan vrijednosti IMP3 bio je za 10 veći u pozitivnom nego negativnom statusu limfnih ćvorova ( $Z = 2,05$ ;  $r = 0,199$ ;  $p = 0,040$ ). Medijan vrijednosti IMP3 bio je za 12,5 veći u planocelularnom karcinomu nego u adenokarcinomu ( $Z = 1,89$ ;  $r = 0,17$ ;  $p = 0,059$ ) na razini značajnosti od 94 %. Postoji razlika u vrijednosti IMP3 između podtipova adenokarcinoma ( $\chi^2 = 5,4$ ;  $p = 0,068$ ) na razini značajnosti od 93 %. Razliku su ćinili acinarni u odnosu na papilarni podtip ( $p = 0,038$ ) te papilarni u odnosu na solidni podtip ( $p = 0,026$ ). Nije dokazana statistićki znaćajna razlika vrijednosti IMP3 s obzirom na limfovaskularnu invaziju ( $Z = 0,472$ ;  $p = 0,637$ ),



patološki stadij bolesti ( $\chi^2 = 3,3$ ;  $p = 0,196$ ), uzorak imunog odgovora ( $\chi^2 = 3,6$ ;  $p = 0,164$ ) i histološki gradus ( $\chi^2 = 4,6$ ;  $p = 0,100$ ).

U Tablici 5. prikazana je povezanost istraživanih varijabla s kvantitativnim izražajem PD-L1.

**Tablica 5.** Prikaz medijana (Q1-Q3; min-max) vrijednosti izražaja PD-L1 u odnosu na ispitivane patohistološke varijable

	Medijan PD-L1 (Q1-Q3; min-max), %	p
Histološki tip	adenokarcinom 0 (0-20; 0-100)	0,699*
	planocelularni 1 (0-25; 0-90)	
Limfovaskularna invazija	nije prisutna 1 (0-50; 0-100)	0,095*
	prisutna 0 (0-4; 0-100)	
Status limfnih čvorova	negativan 0 (0-25; 0-100)	0,705*
	pozitivan 0 (0-5; 0-100)	
Patološki stadij bolesti	1 0 (0-25; 0-100)	0,505**
	2 0 (0-5; 0-90)	
	3 0 (0-5,7; 0-100)	
Uzorak imunog odgovora	odsutan 0 (0-1; 0-90)	0,039**
	slab 0 (0-25; 0-100)	
	jak 3 (0-50; 0-100)	
Gradus	1 0 (0-1; 0-60)	0,119*
	2 0 (0-5; 0-100)	
	3 1 (0-50; 0-100)	
Podtip adenokarcinoma	acinarni 0 (0-12,5; 0-60)	0,014**
	papilarni 0 (0-0; 0-20)	
	solidni 25,5 (0-90; 0-100)	

\* Mann-Whitneyje U-test, \*\* Kruskal-Wallisov test

Postoji značajna razlika vrijednosti izražaja PD-L1 u odnosu na uzorak imunog odgovora ( $\chi^2 = 6,5$ ;  $p = 0,039$ ). U uzorku jakog imunog odgovora značajno je veći medijan vrijednosti izražaja PD-L1 nego u uzorku odsutnog imunog odgovora. Postoji značajna razlika vrijednosti izražaja PD-L1 u odnosu na podtip adenokarcinoma (acinarni, papilarni i solidni) ( $\chi^2 = 8,5$ ;  $p = 0,014$ ); razliku čini solidni podtip prema papilarnom podtipu ( $p = 0,011$ ). Nije

dokazana značajna razlika vrijednosti izražaja PD-L1 u odnosu na histološki tip ( $Z = 0,386$ ;  $p = 0,699$ ), limfovaskularnu invaziju ( $Z = 1,67$ ;  $p = 0,095$ ), status limfnih čvorova ( $Z = 0,378$ ;  $p = 0,705$ ), patološki stadij bolesti ( $\chi^2 = 1,36$ ;  $p = 0,505$ ) i gradus tumora ( $\chi^2 = 4,25$ ;  $p = 0,119$ ).

U 38 slučajeva u metastatskom tumorskom tkivu limfnog čvora analiziran je izražaj IMP3 i PD-L1. IMP3 je bio pozitivan u 19 (50 %) slučajeva, a PD-L1 u 24 (64,9 %) slučajeva.

U Tablici 6. uspoređen je izražaj IMP3 u primarnom karcinomu s izražajem IMP3 u metastatskom limfnom čvoru.

**Tablica 6.** Kvantitativna i kvalitativna povezanost izražaja IMP3 u primarnom karcinomu s izražajem IMP3 u nodalnom metastatskom tumorskom tkivu u 38 ispitanika

IMP3 u primarnom tumoru	Izražaj IMP3 u metastatskom limfnom čvoru (n = 38)			p
	Ukupno	Negativan (0)	Pozitivan (> 0)	
medijan (Q1-Q3; min-max)	0 (0-143; 0-300)	0 (0-20; 0-75)	105 (0-150; 0-300)	0,001*
Negativan	22 (58 %)	12 (63 %)	10 (53 %)	
Pozitivan	16 (42 %)	7 (37 %)	9 (47 %)	0,743**

\* Mann-Whitneyjev U-test, \*\* Fisher's exact test

Medijan vrijednosti izražaja IMP3 u primarnom tumoru ispitanika s metastatskim limfnim čvorovima jest 105, a medijan u ispitanika s IMP3 negativnim limfnim čvorovima 0 ( $Z = 3,2$ ;  $r = 0,52$ ;  $p = 0,001$ ). Razlika medijana je 105 (95 % CI: 33-177). U 53 % ispitanika izražaj je IMP3 u primarnom tumoru bio negativan, a u nodalnoj metastazi pozitivan, dok je u 37 % ispitanika u primarnom tumoru bio pozitivan, a u nodalnoj metastazi negativan.

U Tablici 7. prikazana je povezanost izražaja PD-L1 u primarnom karcinomu s izražajem PD-L1 u metastatskom limfnom čvoru.

Nije dokazana statistički značajna razlika između medijana izražaja PD-L1 u primarnom karcinomu s obzirom na pozitivan ili negativan izražaj PD-L1 u nodalnoj metastazi ( $Z = 0,421$ ;  $p = 0,673$ ). U 58 % ispitanika izražaj PD-L1 u primarnom tumoru bio je negativan, a u nodalnoj metastazi pozitivan, dok je u 40 % ispitanika u primarnom tumoru bio pozitivan, a u nodalnoj metastazi negativan.

**Tablica 7.** Kvantitativna i kvalitativna povezanost izražaja PD-L1 u primarnom karcinomu s izražajem PD-L1 u nodalnom metastatskom limfnom čvoru

	Ukupno	PD-L1 u metastatskom limfnom čvoru		p
		Negativan (0)	Pozitivan (> 0)	
Izražaj PD-L1 u primarnom tumoru; medijan (Q1-Q3; min-max)	0 (0-19; 0-100)	0 (0-60; 0-100)	0 (0-4,5; 0-90)	0,673*
PD-L1; n (%)				1**
Negativan	23 (59)	9 (60)	14 (58)	
Pozitivan	16 (41)	4 (40)	10 (42)	

\* Mann-Whitneyjev U-test, \*\* Fisher's exact test

U multinominalnoj logističkoj regresiji izražaj IMP3 bio je zavisna varijabla, a status limfnih čvorova (negativan/pozitivan) i histološki tip (adenokarcinom/planocelularni karcinom) bile su nezavisne varijable (Tablica 8.).

**Tablica 8.** Rezultati Coxove multinominalne logističke regresije za IMP3 u primarnom tumoru

		OR (95 % CI)	p
Histološki tip	adenokarcinom*	2,8 (1,2-6,6)	0,021
	planocelularni		
Status limfnih čvorova	negativan*	2,3 (0,995-5,5)	0,051
	pozitivan		

\* referentna razina

Prema multinominalnoj logističkoj regresiji, dokazana je povezanost izražaja IMP3 s histološkim tipom i nađena jaka naznaka povezanosti izražaja IMP3 sa statusom limfnih čvorova. Izgled za planocelularni karcinom u odnosu na adenokarcinom jest za 2,8 puta veći u

ispitanika s pozitivnim u odnosu na negativni izražaj IMP3 ( $p = 0,021$ ). Izgled za pozitivni status limfnih čvorova u odnosu na negativni jest za 2,3 puta veći u ispitanika s pozitivnim izražajem IMP3 ( $p = 0,051$ ), što predstavlja statistički graničnu značajnost.

U Tablici 9. prikazani su rezultati log-rank testa praćenih varijabla s obzirom na razdoblje bez povrata bolesti (engl. *disease free survival* – DFS) izraženo u mjesecima.

**Tablica 9.** Analiza ispitivanih varijabla s obzirom na razdoblje bez povrata bolesti (DFS)

		DFS (mj.)	SE	95 % CI	Medijan	LR	p
Spol						0,045	0,832
	muški	24	2,2	20-29	20		
	ženski	24	4	16-32	14		
Histološki tip						0,008	0,930
	adenokarcinom (n = 68)	23,6	2,5	19-28	19		
	planocelularni (n = 35)	23	3,2	17-29	14		
Podtip adenokarcinoma						2,5	0,282
	acinarni	26,5	4	19-34	20		
	papilarni	23	5	13-34	19		
	solidni	17	3	12-22	18		
Gradus						0,534	0,766
	1	27	6	15-39	24		
	2	23	2,5	18-28	19		
	3	24	4	17-31	22		
Limfovaskularna invazija						5,6	0,018
	nije prisutna	29	3	23-35	24		
	prisutna	20	2	15-24	13		
Stadij bolesti						0,661	0,719
	1	25	3	19-30	20		
	2	21	3	16-27	19		
	3	25	5	15-34	12		
Status limfnih čvorova						0,554	0,457
	negativan	25	2	20-29	21		
	pozitivan	22	3,5	15-29	12		
IMP3 u tumoru						1,76	0,184
	negativan	26	3	21-32	21		
	pozitivan	21	3	16-26	14		
PD-L1 u tumoru						0,397	0,528
	negativan	23	3	17-28	17		

	pozitivan	26	3	20-31	21		
Uzorak imunog odgovora						0,037	0,982
	odsutan	24	3	18-30	19		
	slab	23	3	17-30	18		
	jak	23	4	15-31	21		

Ispitanici bez limfovaskularne invazije u tumoru imali su prosječno devet mjeseci duže razdoblje bez povrata bolesti (LR = 5,6, p = 0,018).

Relativni rizik za vremenski interval bez povrata bolesti prikazan je u Tablici 10.

**Tablica 10.** Rezultati Coxove regresijske uninominalne analize relativnog rizika za vremenski interval bez povrata bolesti

	HR	95 % CI	p
Spol	1,05	0,66-1,6	0,836
ženski*			
muški			
Histološki tip	0,98	0,63-1,5	0,932
adenokarcinom (n =68*			
Podtip adenokarcinoma	1,3	0,91-1,7	0,176
acinarni*			
papilarni			
solidni			
Gradus	1,1	0,77-1,4	0,732
1*			
2			
3			
Limfovaskularna invazija	1,6	1,1-2,5	0,023
nije prisutna			
prisutna*			
Stadij	1,0	0,79-1,3	0,869
1*			
2			
3			
Status limfnih čvorova	1,14	0,88-1,5	0,323
negativan*			
pozitivan			
IMP3 u tumoru	1,3	0,87-2	0,196
negativan*			
pozitivan			
PD-L1 u tumoru	0,85	0,38-1,9	0,701

	negativan*			
	pozitivan			
Upalni odgovor	1,0	0,77-1,3	0,925	
	odsutan/slab			
	jak*			

Relativni rizik za povratak bolesti u skupini ispitanika koji su imali limfovaskularnu invaziju bio je za 1,6 puta veći nego u ispitanika bez limfovaskularne invazije (95 % CI: 1,1-2,5; p = 0,023).

U razdoblju praćenja samo 17 (15,7 %) od 108 ispitanika nije dobilo udaljenu metastazu. Najčešća metastatska sjela prikazana su u Tablici 11.

**Tablica 11.** Duljina razdoblja bez povrata bolesti (DFS) s obzirom na sjelo metastaze

	DFS (mj.)	SE	95 % CI	Medija n	LR	p
<u>Sjelo metastaze</u>					5	0,284
medijastinum 24 (22,2 %)	14	2	9-19	10		
pluća 42 (38,9 %)	22	3	16-27	17		
mozak 9 (8,3 %)	17	3	11-23	20		
skelet 7 (6,5 %)	24	5	14-34	24		
intraabdominalno 9 (8,3 %)	18	4	9-26	14		

Nije utvrđena značajna razlika u duljini razdoblja bez povrata bolesti s obzirom na sjelo metastaze.



Opće preživljenje ispitanika s obzirom na ispitivane varijable prikazano je u Tablici 12.

**Tablica 12.** Analiza općeg preživljenja (OS) prema ispitivanim varijablama log-rank testom

		OS (mj.)	SE	95% CI	Medijan	LR	p
Spol	muški	46	3,9	38-53	44	1,65	0,199
	ženski	50	5	41-60			
Histološki tip	adenokarcinom (n=68)	49,8	3,9	42,2-57,5	62	2,14	0,143
	planocelularni (n=35)	42,4	5,6	31,4-53,5	38		
	Podtip adenokarcinoma acinarni	59	4,6	50-68	68	4,5	0,009
	papilarni	43,5	7,8	28-59	37		
	solidni	24,8	3	18,9-31	27		
Gradus	1	51	6,6	38-64	62	1,07	0,585
	2	47,2	4,2	39-55	48		
	3	45,2	6,6	32-58	34		
	Limfovaskularna invazija	58	5	48-68	68	6,3	0,012
	da	38,8	4	31-47	37		
Stadij bolesti	1	52,4	4,4	44-61	62	2,99	0,224
	2	44	6	33-56	38		
	3	38	5,5	27-49	37		
Status limfnih čvorova	negativan	51	4	42-59	53	1,4	0,235
	pozitivan	41	5	31-51	37		
IMP3	negativan	51,4	4,6	42-60	53	0,647	0,421
	pozitivan	43	4,6	34-52	44		
PD-L1	negativan	47,9	4,5	39-57	44	0,215	0,643
	pozitivan	47	4,7	38-56	48		

Uzorak imunog odgovora

odsutan	43,5	4,7	34-53	37	2,8	0,246
slab	46	5	36-56	49		
jak	58	6	45-71			

---

Od 108 ispitanika u promatranom vremenskom razdoblju umrlo je njih 47. Prosjek preživljenja bio je 48,7 mjeseci (SE: 3,5 mjeseci; 95 % CI: 42 – 55 mjeseci), a medijan preživljenja 48 mjeseci (SE: 8 mjeseci; 95 % CI: 32 – 63). Prosječno preživljenje ispitanika s acinarnim podtipom bilo je za 15,5 mjeseci veće nego u ispitanika s papilarnim podtipom i za 34 mjeseca veće nego u ispitanika sa solidnim podtipom. Prosječno preživljenje u ispitanika s papilarnim podtipom bilo je za 18,7 mjeseci veće nego u ispitanika sa solidnim podtipom ( $p = 0,009$ ). U ispitanika s limfovaskularnom invazijom prosječno preživljenje bilo je kraće za 19,2 mjeseci u odnosu na ispitanike bez limfovaskularne invazije ( $p = 0,012$ ). U skupini ispitanika s pozitivnim medijastinalnim limfnim čvorovima (“N2 bolest”) prosječno preživljenje bilo je 32 mjeseca (SE = 6 mjeseci; 95 % CI: 19,5 – 44 mjeseca), a u skupini s negativnim limfnim čvorovima (“N0 bolest”) ili pozitivnim hilarnim limfnim čvorovima (“N1 bolest”) 51 mjesec (SE = 4 mjeseca; 95 % CI: 43 – 58 mjeseci). Dužina preživljenja bolesnika s pozitivnim medijastinalnim limfnim čvorovima bila je za 20 mjeseci kraća nego ostalih ispitanika (LR = 3,4;  $p = 0,066$ ).

Nije dokazana značajna razlika u prosječnom preživljenju po spolu ( $p = 0,199$ ), tipu karcinoma ( $p = 0,143$ ), veličini tumora ( $p = 0,631$ ), histološkom gradusu ( $p = 0,585$ ) te izražaju IMP3 i PD-L1 ( $p = 0,421$  odnosno  $p = 0,643$ ).

Nije dokazana razlika u prosječnom preživljenju ispitanika u II. i III. stadiju bolesti (LR = 0,029;  $p = 0,864$ ). Prosječno preživljenje u obje skupine zajedno bilo je 43,4 mjeseca (SE = 4,5; 95 % CI: 35 – 52). Međutim, postoji statistički značajna razlika u prosječnom preživljenju tih dviju skupina u odnosu na skupinu ispitanika u I. stadiju na razini značajnosti od 92 % (LR: 2,9;  $p = 0,086$ ).

Između skupina ispitanika s uzorkom odsutnog i slabog imunog odgovora nije dokazana značajna razlika u preživljenju (LR = 0,445;  $p = 0,505$ ); prosječno preživljenje bilo je 46 mjeseci (SE = 4; 95 % CI: 39 – 53). Postoji razlika u preživljenju tih skupina zajedno u odnosu na skupinu s uzorkom jakog imunog odgovora na razini značajnosti od 90 % (LR: 2,3;  $p = 0,132$ ). Razlika u prosječnom preživljenju bila je 12 mjeseci.

U Tablici 13. analizirano je opće preživljenje ispitanika prema praćenim varijablama uporabom Coxove regresijske uninominalne analize.

**Tablica 13.** Coxova regresijska uninominalna analiza preživljenja prema ispitivanim varijablama

		HR	95 % CI	p
Spol	muški*	0,636	0,32-1,28	0,206
	ženski			
Histološki tip	adenokarcinom (n = 68)*	1,3	0,8-2,02	0,304
	planocelularni (n = 35)			
Podtip adenokarcinoma	acinarni*			0,016
	papilarni	1,96	0,7-5,5	0,203
	solidni	4,2	1,6-11,4	0,004
Gradus	1*	1,26	0,8-1,97	0,313
	2			
	3			
Limfovaskularna invazija	nije prisutna*	2,15	1,17-3,98	0,015
	prisutna			
Patološki stadij bolesti	1*	1,33	0,94-1,9	0,108
	2			
	3			
Status limfnih čvorova	negativan*	1,4	0,79-2,5	0,241
	pozitivan			
IMP3	negativan*	1,3	0,7-2,3	0,426
	pozitivan			
PD-L1		0,87	0,48-1,6	0,646

	negativan*		
	pozitivan		
Uzorak imunog odgovora	Odsutan/slab* 2	0,79-5	0,142
	Jak		
Dob	1,02	0,98-1,05	0,353

Rizik smrtnog ishoda statistički je značajno ovisan o podtipu adenokarcinoma ( $p = 0,016$ ). Za 4,2 puta bio je veći u ispitanika sa solidnim podtipom nego u ispitanika s acinarnim podtipom adenokarcinoma ( $p = 0,004$ ). Rizik od smrtnog ishoda nije se značajno razlikovao između ispitanika s acinarnim i papilarnim podtipom ( $p = 0,203$ ) te papilarnim i solidnim podtipom adenokarcinoma ( $p = 0,198$ ). S obzirom na to da je rizik od smrtnog ishoda u solidnom podtipu najveći, promatran je u odnosu na acinarni i papilarni podtip te je utvrđeno da je za 1,84 puta veći (95 % CI: 1,2 – 2,9;  $p = 0,007$ ) u odnosu na ostale podtipove adenokarcinoma.

Rizik smrtnog ishoda je za 2,15 puta veći u ispitanika s limfovaskularnom invazijom u odnosu na ispitanike bez limfovaskularne invazije ( $p = 0,015$ ). Ako se promatra preživljenje u I. stadiju u odnosu na II. i III. stadij zajedno, za 1,7 puta veći je rizik smrtnog ishoda u višim stadijima, sa značajnosti razlike od 91 % - HR = 1,7 (95 % CI = 0,92 – 3;  $p = 0,091$ ). Rizik smrtnog ishoda u skupini ispitanika s pozitivnim medijastinalnim limfnim čvorovima za 1,86 puta veći je nego u ostalih (95 % CI = 0,94 – 3,7;  $p = 0,072$ ).

U Tablici 14. analizirano je preživljenje prema ispitivanim varijablama uporabom Coxove regresijske multinominalne analize.

**Tablica 14.** Coxova regresijska multinominalna analiza preživljenja prema ispitivanim varijablama

		HR	95 % CI	p
Podtip adenokarcinoma	acinarni + papilarni*	1,7	1,0-2,7	0,034
	solidni			
Limfovaskularna invazija	nije prisutna*	2,0	0,76-5,5	0,157
	prisutna			
Patološki stadij bolesti	1*	2,9	0,82-10	0,100
	2			
	3			
Status limfnih čvorova	negativan*	0,19	0,02-2,1	0,175
	pozitivan			

Multinominalnom regresijskom analizom potvrđena je povezanost rizika smrtnog ishoda sa solidnim podtipom adenokarcinoma u odnosu na ostale podtipove adenokarcinoma ( $p = 0,034$ ).

U Tablici 15 prikazana je razdioba ispitanika po duljini preživljenja  $\leq 24$  mjeseca i  $> 24$  mjeseca u odnosu na ispitivane varijable.

**Tablica 15.** Prikaz istraživanih varijabla u odnosu na duljinu preživljenja ( $\leq 24$  mjeseca;  $> 24$  mjeseca)

		Umrli ispitanici			p
		ukupno (n=47)	$\leq 24$ mjeseca	$> 24$ mjeseca	
Status limfnih čvorova	negativan	28 (60 %)	16 (55 %)	12 (67 %)	0,635
	pozitivan	19 (40 %)	13 (45 %)	6 (33 %)	
IMP3	negativan	26 (56 %)	16 (57 %)	10 (56 %)	1
	pozitivan	20 (44 %)	12 (43 %)	8 (44 %)	
PD-L1	negativan	29 (62 %)	20 (69 %)	9 (50 %)	0,321
	pozitivan	18 (38 %)	9 (31 %)	9 (50 %)	
Gradus	1	6 (13 %)	2 (7 %)	4 (22 %)	
	2	24 (32 %)	14 (50 %)	10 (56 %)	
	3	16 (35 %)	12 (43 %)	4 (22 %)	
Limfovaskularna invazija	nije prisutna	16 (34 %)	9 (31 %)	7 (39 %)	0,814
	prisutna	31 (66 %)	20 (69 %)	11 (61 %)	
Histološki tip	adenokarcinom	25 (56 %)	16 (57 %)	9 (53 %)	1
	planocelularni	20 (44 %)	12 (43 %)	8 (47 %)	
Podtip adenokarcinoma	acinarni	9 (37,5 %)	5 (33,3 %)	4 (44,4 %)	
	papilarni	6 (25 %)	4 (26,7 %)	2 (22,2 %)	
	solidni	9 (37,5 %)	6 (40 %)	3 (33,3 %)	

Od 47 ispitanika koji su umrli u promatranom razdoblju, njih 18 (24 %) živjelo je više, a 29 manje od dvije godine. Medijan preživljenja ispitanika u prvoj skupini bio je 37 mjeseci

(Q1-Q3 = 32-50; min-max: 27 – 68 mjeseci), a u drugoj 10 mjeseci (Q1-Q3 = 6-16; min-max: 1 – 24 mjeseca). Skupine se nisu značajno razlikovale po praćenim varijablama. Zanimljivo je da su od 47 umrlih samo petorica imala uzorak jakog imunog odgovora u tumoru i bili u skupini ispitanika koji su živjeli dulje od dvije godine.





U operiranom primarnom tumoru i metastatskom limfnom čvoru bolesnika s NSCLC-om koji nisu predoperativno liječeni imunohistokemijski smo analizirali IMP3, povezan s metastaziranjem i PD-L1 koji blokiranjem imunog prepoznavanja dovodi do imune evazije. Njihov izražaj korelirali smo s patološkim pokazateljima i ishodom bolesti. Utvrdili smo povezanost izražaja IMP3 u tumorskim stanicama s nalazom nodalnih metastaza, kao i povezanost izražaja PD-L1 u tumorskim stanicama s uzorkom tumorskog imunog mikrokoliša.

### **5.1. Povezanost izražaja IMP3 u tumorskim stanicama s kliničko-patološkim pokazateljima i mjerama ishoda**

IMP3 je dobro poznat imunohistokemijski biljeg agresivnosti tumora koji je dosada potvrđen u više studija o NSCLC-u (47). Hong i suradnici analizirali su biljege metilacije DNK u uzorcima krvi koji bi mogli poboljšati ranu dijagnozu raka pluća (48). Autori su u uzorku od 150 ispitanika s NSCLC-om i 150 podudarnih zdravih kontrola analizirali profile metilacije na cijelom genomu i otkrili dvije značajne različito metilirane promjene (cg25429010 [IMP3]) i (cg12169243 [DPH6]), povezane s NSCLC-om u sadašnjih pušača.

Prema studiji Beljan Perak i suradnika iz 2012. na bioptičkim uzorcima pluća iz KBC-a Split, izražaj IMP3 u adenokarcinomu povezan je sa solidnim podtipom i udaljenim metastazama (43). Del Gobbo i suradnici potvrdili su nepovoljnu prognostičku ulogu IMP3 u metastaziranju NSCLC-a u mozak (49).

U našoj smo studiji dokazali da je izražaj IMP3 u primarnom tumoru povezan s postojanjem nodalnih metastaza ( $p = 0,04$ ). Prognostička vrijednost nodalnog statusa je velika (50). Pravovremena informacija o pozitivnom izražaju agresivnog biljega IMP3 u bioptičkom uzorku raka pluća trebala bi pri operaciji NSCLC-a navesti torakalnog kirurga na što minuciozniju medijastinalnu limfadenektomiju, jer će time omogućiti mikroskopsku analizu maksimalnog broja limfnih čvorova. Sukladno podacima iz literature, u našem je uzorku izražaj IMP3 bio rjeđe pozitivan u adenokarcinomu nego u planocelularnom karcinomu (51). Nismo potvrdili rezultat Beljan Perak i suradnika da je solidni podtip češće izražavao IMP3 od ostalih podtipova ADC-a (43). Sun i suradnici utvrdili su povezanost izražaja IMP3 u tumoru s uznapređovalim stadijem, veličinom tumora, višim gradusom i predominantno solidnim podtipom (42).

U multivarijantnoj logističkoj regresiji potvrđena je povezanost histološkog tipa i jaka naznaka povezanosti statusa limfnih čvorova s izražajem IMP3. Ispitanici s pozitivnim

izražajem IMP3 imali su 2,8 puta veću vjerojatnost da imaju planocelularni karcinom nego adenokarcinom i 2,3 puta češće nodalnu metastatsku bolest.

Nismo utvrdili povezanost izražaja IMP3 s DFS-om i OS-om. U našem je uzorku medijan OS-a ispitanika s IMP3 pozitivnim kacinomom bio devet mjeseci kraći nego u IMP3 negativnom karcinomu, ali bez statistički značajne razlike. Chen i suradnici su dokazali da je jaki izražaj IMP3 u tumorskim stanicama značajno povezan s kraćim OS-om u većini solidnih tumora pa tako i karcinoma pluća (40). Zhang i suradnici smatraju IMP3 neovisnim prognostičkim biljekom u NSCLC-u (52). Burdelski i suradnici su na uzorku od 673 karcinoma pluća analizirali agresivne čimbenike i dokazali da su ispitanici s IMP3 pozitivnim tumorom bili češće dijagnosticirani u uznapredovalom stadiju bolesti i imali kraći OS (47).

## **5.2. Povezanost izražaja PD-L1 u tumorskim stanicama s kliničko-patološkim pokazateljima i mjerama ishoda**

Osim patološke analize pokazatelja relevantnih za dijagnozu i prognozu, pregled operiranoga tumorskog tkiva u imunoterapijski naivnih ispitanika pruža mogućnost istraživanja heterogenosti izražaja PD-L1 u tumorskim stanicama i njihove interakcije s tumorskim imunim mikrookolišem. Danas je ta interakcija u središtu pozornosti jer se zna da iR-i, u koje spada PD-1, imaju ključnu ulogu i u obrani tumora od imunološkog prepoznavanja i u oblikovanju tumorskog mikrookoliša. Prema Herbstu i suradnicima nema bitne razlike između procjene izražaja PD-L1 i preživljenja na arhivskom i svježe prikupljenom bioptičkom materijalu (53). U ovom je radu na arhivskom operativnom materijalu NSCLC-a u primarnom tumoru i nodalnom metastatskom tumoru analiziran izražaj PD-L1 na tumorskim stanicama i ispitana povezanost PD-L1 sa svim praćenim kliničkim i patološkim pokazateljima, uključujući uzorak tumorskoga imunog mikrookoliša.

Prema našim rezultatima medijan izražaja PD-L1 razlikuje se u podtipovima adenokarcinoma na račun značajno manje vrijednosti u papilarnom nego u solidnom podtipu ( $p = 0,014$ ). U radu Miyatawe i suradnika solidni i acinarni podtip imali su češće PD-L1 pozitivan status nego papilarni podtip (54). S druge strane, Igarashi i suradnici nisu našli značajne razlike u H-skoru među podtipovima adenokarcinoma (55). Moguće objašnjenje za naš rezultat jest građa papilarnog podtipa koji dijelom raste u alveolarnim prostorima i u manjem je izravnom kontaktu s imunološkim mikrookolišom od solidnog i acinarnog podtipa, a time je manja mogućnost indukcije PD-L1/PD1 funkcionalnog puta. Zhang i suradnici nisu našli pozitivan

izražaj PD-L1 u adenokarcinomu *in situ* i minimalno invazivnom adenokarcinomu, što je u suglasju s recentnim nalazom Miyatawe i suradnika da je u vrlo ranoj fazi karcinoma potrebno vrijeme za njegovu aktivaciju (54, 56).

Drugi važan rezultat u ovom je radu povezanost između medijana izražaja PD-L1 u tumorskim stanicama i uzorka imunog odgovora u tumorskom mikrookolišu jer je u jakom (upali sličnom) imunom odgovoru izražaj PD-L1 značajno veći nego u slabom i odsutnom imunom odgovoru ( $p = 0,039$ ). Takve nalaze objavili su i drugi autori. Lin i suradnici su analizirali imunohistokemijski izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama NSCLC-a i usporedili ga s gustoćom tumor-infiltrirajućih limfocita na hemalaun-eozinskom bojanom preparatu te našli različite kombinacije i utvrdili da postoji povezanost između izražaja PD-L1 i veće prisutnosti tih limfocita (57). Tancoš i suradnici te Brambilla i suradnici utvrdili su povezanost između izražaja PD-L1 i prisutnosti tumor-infiltrirajućih CD3+ T-limfocita u reseciranom NSCLC-u i označili dezmozoplastične zone u tumoru kao imunološki neaktivni mikrookoliš (58, 59). Inoue i suradnici opisali su jaku infiltraciju imunih stanica kao patološki čimbenik koji predviđa pozitivan izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama (60). Različiti imunotipovi tumorskog mikrookoliša utječu na preživljenje bolesnika s adenokarcinomom i planocelularnim karcinomom, što upućuje na važnost integrirane procjene PD-L1 statusa koja uključuje i analizu imunog odgovora. Ojlert i suradnici ustanovili su da u bolesnika s adenokarcinomom velik broj imunih stanica u tumorskom mikrookolišu povoljno utječe na preživljenje bez progresije bolesti (61). Autori su povezali različit genski mutacijski uzorak u ta dva tipa karcinoma s drukčijim tumorskim imunim mikrookolišem. Shimizu je u svojoj studiji na 170 bolesnika s NSCLC-om dokazao kako je prognoza u bolesnika s negativnim PD-L1 statusom i gustim infiltratom CD8+ T-limfocita značajno bolja nego u drugim ispitivanim skupinama, što upućuje na potrebu supklasifikacije NSCLC-a prema tipu tumorskog mikrookoliša (62).

Mazzashi i suradnici upozorili su na klinički značaj imunog mikrookoliša i na potrebu da se, uz izražaj PD-L1, omjerom kvantificira rezervoar PD-1 negativnih CD8 limfocita (63). Autori smatraju da je manji omjer povezan s boljim preživljenjem bolesnika s operiranim NSCLC-om i s dobrim odgovorom na imunoterapiju u bolesnika s uznapredovalim NSCLC-om. Takamori i suradnici su u uzorku ispitanika u kojih je analiziran primarni karcinom i njegova metastaza u pluća ustanovili razliku u izražaju PD-L1 na tumoru pridruženim imunim stanicama. Te su stanice bile brojnije u metastatskom tumorskom sijelu negoli u parnom primarnom tumoru, dok se broj PD-L1 pozitivnih tumorskih stanica nije značajno razlikovao (64). Razliku u tumorskom mikrookolišu i izražaju PD-L1 autori su također potvrdili usporednom analizom na uzorku ispitanika s NSCLC-om i udaljenom metastazom, te upozorili

kliničare koji liječe imunoterapijom da te razlike trebaju imati na umu (65). Uspoređujući izražaj PD-L1 u primarnom tumoru i nodalnoj metastazi, nismo utvrdili značajnu povezanost. Sličan rezultat objavili su Xu i suradnici u analizi tumorskog tkiva 77 ispitanika s operiranim NSCLC-om (66).

U našem radu nije utvrđena značajna povezanost izražaja PD-L1 s tipom NSCLC-a. S druge strane, Lin i suradnici te Janzič i suradnici izvještavaju o značajnoj povezanosti planocelularnog karcinoma s pozitivnim PD-L1 statusom tumorskih stanica (57, 67).

Za razliku od Pawelczyk i suradnika, nismo našli poveznost s histološkim gradusom ni s višim nodalnim statusom (68).

U analizi kliničkog ishoda nismo pronašli značajnu povezanost između izražaja PD-L1 u tumoru i općeg preživljenja. Pawelczyk i suradnici su u uzorku tkivnih mikronizova tumorskog tkiva 866 ispitanika s NSCLC-om dokazali da je izražaj PD-L1 bio povezan s kraćim preživljenjem ispitanika s adenokarcinomom (68). Moguće da je razlika između naših rezultata nastala zbog manjeg broja slučajeva u našoj studiji i zbog primjene različitih histoloških tehnika.

U našem uzorku nije bilo razlike u medijanu izražaja PD-L1 u primarnom tumoru s obzirom na pozitivan ili negativan PD-L1 status u nodalnom metastatskom tkivu. To se indirektno slaže s rezultatima studije Inoue i suradnika koji su FISH metodom uspoređivali primarni tumor i sinkronu nodalnu metastazu u 654 resecirana NSCLC-a i potvrdili dosljednost genskih promjena (amplifikacija PD-L1 u 3,1 % i polisomija u 13,2 % slučajeva) koje su bile usporedive s izražajem PD-L1 (u 30,7 % slučajeva) i povezane s lošijom prognozom (60).

U ovoj studiji nismo utvrdili razliku u izražaju PD-L1 s obzirom na dob bolesnika, premda je dostupno više izvješća o povezanosti izražaja PD-L1 s mlađom dobi, primjerice u karcinomu želudca (69), vrata maternice (70) i jednjaka (71).

Također, u našem uzorku nije bilo značajne razlike u izražaju PD-L1 po spolu. U interesantnoj studiji Gu Y i suradnika u krvi žena s NSCLC-om nađena je veća koncentracija serumskog PD-1 i membranskog PD-1 na CD4 T-limfocitima nego u muškaraca te povišena razuna serumskog testosterona u odnosu na kontrolnu skupinu. Uz to, autori upozoravaju na kontinuiran porast incidencije adenokarcinoma pluća u žena (72).

Wei XL i suradnici uočili su povezanost izražaja PD-L1 u jetrenoj metastazi kolorektalnog karcinoma s primarnim tumorom. Jači izražaj PD-L1 u primarnom tumoru češće je doveo do jetrenog rasapa bolesti, a izražaj PD-L1 u jetrenoj metastazi bio je značajno jači nego u primarnom tumoru, vjerojatno zbog intrinzičnih razlika u mikrookolišu (73). U ovoj studiji uspoređivali smo samo PD-L1 status primarnog tumora i nodalne metastaze i nismo

utvrdili značajnu razliku. Međutim, neki su tumori s pozitivnim PD-L1 statusom imali PD-L1 negativnu nodalnu metastazu i obrnuto, što može upućivati na to da dinamika izražaja PD-L1 ovisi o tumorskom imunom mikrookolišu.

Najkraće vrijeme bez povrata bolesti imali su ispitanici s metastatskim sijelom u medijastinumu, ali statistički značajna razlika u DFS-u s obzirom na sijelo nije nađena.

U svojoj studiji Jiang i suradnici upućuju na to da mutacijsko opterećenje tumora, izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama i infiltracija imunim stanicama utječu na imunološki odgovor i ishod bolesti (74). U našoj studiji ispitanici s jakim, upali sličnim imunim odgovorom imali su 12 mjeseci duže preživljenje od ispitanika sa slabim/odsutnim imunim odgovorom. Od 47 ispitanika umrlih u praćenom razdoblju, njih 29 umrlo je u razdoblju kraćem od dvije godine, a 18 ih je živjelo dulje od dvije godine. Između tih dviju skupina nismo utvrdili značajnu razliku ni u kojoj analiziranoj varijabli, ali je indikativno da je samo pet od 47 umrlih ispitanika imalo jaki imuni odgovor i svi su živjeli duže od dvije godine. To upućuje na to da je u NSCLC-u jaki imuni odgovor prognostički povoljniji nego kada je slab ili odsutan.

U solidnom podtipu adenokarcinoma rizik od smrti bio je 1,84 puta veći nego u ostalim podtipovima adenokarcinoma. Zhang i suradnici također su pokazali da je solidni podtip nezavisan loš prognostički čimbenik povezan s kraćim DFS-om i OS-om (75). Ispitanici s tim podtipom češće su bili podvrgnuti bilobektomiji/pulmektomiji i imali druge nepovoljne patološke pokazatelje, poput limfovaskularne invazije i nodalne bolesti. To se podudara s rezultatima naše studije u kojoj su ispitanici s predominantno solidnim podtipom imali 4,2 puta veći rizik smrti od ispitanika s acinarnim podtipom. U svih je ispitanika rizik od smrti bio 2,15 puta veći ako su imali limfovaskularnu invaziju. Ispitanici s bolesti N2 imali su 1,86 puta veći rizik od smrti nego ispitanici s bolesti N0 i N1.

Ograničenje ove retrogradne presječne studije jest njezin deskriptivan karakter i klasična mikroskopska analiza umjesto nama nedostupne objektivne analize računalnim programom umjetne inteligencije. Među kliničkim podacima najčešće nije bilo podatka o pušenju koji zato nije analiziran s drugim varijablama. Vrijednost je studije u tome što je ona iz realnog života, a ispitanici su dijagnosticirani i liječeni u jednoj ustanovi. Nadalje, studija je urađena na operativnom materijalu karcinoma pluća imunoterapijski naivnih bolesnika te je pritom svakom ispitaniku analizirano tumorsko tkivo u cijelom parafinskom bloku, a ne na tkivnim mikronizovima.

U zaključku, u ovoj retrogradnoj studiji ispitali smo značaj izražaja PD-L1 u karcinomu ispitanika operiranih zbog NSCLC-a u razdoblju od 2012. do 2018. godine. Danas se PD-L1

rutinski analizira na bioptičkim uzorcima radi potencijalne imunoterapije koja uz TKI predstavlja paradigmu suvremenog liječenja metastatske bolesti. Praktični cilj postao je rano otkrivanje raka pluća, precizna histološka i molekularna dijagnostika i kirurško odstranjenje karcinoma/regionalnih limfnih čvorova. To će bolesniku s NSCLC-om dati neko vrijeme bez bolesti, a nakon njezina obično neminovnog povrata, onkološko liječenje uključit će najčešće i imunoterapiju. U ovom radu dokazali smo povezanost izražaja PD-L1 s jakom infiltracijom imunih stanica, odnosno upali sličnom uzorku tumorskog mikrookoliša. Njihova interakcija samo je dio odnosa svih stanica “na terenu”, kako u tumorskom okolišu primarnog tumora, tako i u nodalnim i distalnim metastazama u kojima se te interakcije trebaju dalje istražiti.

## **6. ZAKLJUČAK**

Pozitivan izražaj IMP3 povezan je s planocelularnim karcinomom i s postojanjem nodalnih metastaza.

Prisutnost limfovaskularne invazije neovisno utječe na kraći DFS i OS, a nodalne metastaze i viši stadij bolesti na kraći DFS i OS.

Nije nađena povezanost PD-L1 i IMP3 s drugim praćenim varijablama niti s mjerama ishoda.

Izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama ovisi o imunom tumorskom mikrookolišu NSCLC-a te jak, upali sličan imuni mikookoliš statistički značajno korelira s većim izražajem PD-L1.

Među podtipovima adenokarcinoma postoji statistički značajna razlika u izražaju PD-L1, koji je u papilarnom podtipu najčešće negativan.



## **7. SAŽETAK**

**Cilj studije:** Analizirati izražaj PD-L1 i IMP3 u nesitnostaničnom karcinomu pluća (NSCLC) i usporediti ga s odgovorom tumorskog imunog mikrookoliša (TIM), kliničko-patološkim parametrima, vremenom bez povrata bolesti (DFS) i općim preživljenjem (OS).

**Materijal i metode:** Uzorak uključuje 76 ispitanika i 32 ispitanice koji su zbog NSCLC-a bili podvrgnuti operaciji u KBC-u Split od 2012. do 2018. godine i nisu liječeni tirozin-kinaznim inhibitorima niti imunoterapijom. Iz parafinskih blokova tumorskog tkiva izrezani su preparati i strojno imunohistokemijski obojeni na PD-L1 (22C3, DAKO, Glostrup, Danska) i IMP3 (DAKO). Preparati su analizirani na svjetlosnom mikroskopu Olympus BX46. Izražaj PD-L1 je vrednovan kao postotak pozitivnih tumorskih stanica među zloćudnim stanicama, a izražaj IMP3 izračunan kao H-skor.

**Rezultati:** Srednja dob muškaraca bila je 66, a žena 64 godine. Adenokarcinom je dijagnosticiran u 68 (63 %), planocelularni karcinom u 35 (32 %) i NSCLC drukčije nespecificiran u pet (5 %) slučajeva. Ispitanici, njih 50 (47,2 %) bilo je je u I., njih 31 (29,2 %) u II. i njih 25 (23,6 %) u III. stadiju bolesti. Metastatsku nodalnu bolest imalo je 38 (36 %) ispitanika, njih 18 kao N1 i njih 20 kao N2. Ispitanici su praćeni do 1. 01. 2019. godine. Prosječno vrijeme bez pojave bolesti bilo je 17 mjeseci, medijan preživljenja za muškarce bio je 44, a za žene 62 mjeseca. Spol, dob i histološki tip nisu povezani s izražajem PD-L1 (svi  $p > 0,05$ ). Podtipovi adenokarcinoma povezani su s izražajem PD-L1 ( $p = 0,01$ ) tako da je papilarni podtip 4,3 puta češći među PD-L1 negativnim, a solidni podtip 1,9 puta češći među PD-L1 pozitivnim slučajevima. Odgovor TIM-a bio je jak u 19 NSCLC-a, slab u 36 i odsutan u 53 slučaja. Medijan izražaja PD-L1 povezan je s TIM-om ( $p = 0,039$ ). Izražaj PD-L1 nije povezan s DFS-om ni s OS-om ( $p = 0,643$ ). Ispitanici s jakim upali sličnim odgovorom u TIM-u imaju 12 mjeseci duži OS nego ispitanici s odsutnim/slabim imunim odgovorom (LR = 2,8;  $p = 0,132$ ). Izražaj IMP3 povezan je sa solidnim podtipom ( $p = 0,02$ ) i granično povezan s pozitivnim nodalnim statusom ( $p = 0,051$ ).

**Zaključak:** Jak upali sličan odgovor u TIM-u povezan je s pozitivnim izražajem PD-L1 u tumoru, a pozitivan izražaj IMP3 u primarnom tumoru s postojanjem nodalnih metastaza. Limfovaskularna invazija značajno smanjuje DFS i OS, a solidni podtip adenokarcinoma povezan je s kraćim OS-om.

## **8. SUMMARY**

**TITLE:** The significance of IMP3 and PD-L1 expression in operable non-small cell lung carcinoma

**Aim of the study:** to analyze the expression of PD-L1 and IMP3 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and compare it with the response of the tumor immune microenvironment (TIM), clinico-pathological parameters, disease-free survival (DFS) and overall survival (OS).

**Material and methods:** The sample includes 76 males and 32 females who underwent surgery for NSCLC at University hospital Split in the period 2012-2018 and did not receive tyrosine kinase inhibitor therapy or immunotherapy at all. Slides were cut from paraffin blocks of tumor tissue and immunohistochemically stained for PD-L1 (22C3, DAKO, Glostrup, Danska) and IMP3 (DAKO). The histologic slides were analyzed on an Olympus BX46 light microscope. PD-L1 expression was evaluated as the percentage of positive tumor cells among malignant cells, and IMP3 expression was calculated as H score.

**Results:** The median age of men was 66 years, and women 64 years. Adenocarcinoma was diagnosed in 68 (63%), squamous cell carcinoma in 35 (32%) and NSCLC not otherwise specified in 5 (5%) cases. 50 (47.2%) patients were in stage I, 31 (29.2%) in stage II and 25 (23.6%) in stage III of the disease. 38 (36%) patients had metastatic nodal disease, 18 as N1 and 20 as N2. Follow up was until January 1, 2019. The average DFS was 17 months, and the median survival for men was 44 and for women 62 months. Gender, age and histological type were not associated with PD-L1 expression (all  $p > 0.05$ ). Adenocarcinoma subtypes were associated with PD-L1 expression ( $p = 0.01$ ) such that the papillary subtype was 4.3 times more frequent among PD-L1 negative and the solid subtype 1.9 times more frequent among PD-L1 positive cases. TIM response was strong in 19 NSCLC, weak in 36 and absent in 53 cases. Median expression of PD-L1 positively correlated with strong, inflammation-like TIM response ( $p = 0.039$ ). PD-L1 expression was not associated with DFS and OS ( $p = 0.643$ ). Patients with a strong TIM response had a 12-month longer OS than patients with an absent/weak response (LR = 2.8;  $p = 0.132$ ). IMP3 expression was associated with planocellular carcinoma ( $p = 0.05$ ), solid subtype of adenocarcinoma ( $p = 0.02$ ) and borderline associated with positive nodal status ( $p = 0.051$ ).

**Conclusion:** A strong inflammatory-like response in TIM is associated with positive expression of PD-L1 in the tumor, and positive expression of IMP3 in the primary tumor with the presence of nodal metastasis. Lymphovascular invasion significantly reduces DFS and OS, and the solid adenocarcinoma subtype is associated with shorter OS.

## **9. POPIS LITERATURE**

1. International WCRF. Lung cancer Statistics. 2020; Dostupno s: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/lung-cancer-statistics/>.
2. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health*. 2019;85(1). Epub 2019/02/12.
3. Malvezzi M, Santucci C, Boffetta P, Collatuzzo G, Levi F, La Vecchia C i sur. European cancer mortality predictions for the year 2023 with focus on lung cancer. *Ann Oncol*. 2023;34(4):410-9. Epub 20230306.
4. HZJZ. Incidencije raka u Hrvatskoj 2020. godine. 2020. Bilten br.45 Dostupno s: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2022/11/Bilten-Incidencija-raka-u-Hrvatskoj-2020.-godine.pdf>
5. Jukica L, Sekovski B, Šimundža I, Mladinov S, Čapkun V, Glavina Durdov M. Analysis of overall survival in patients with lung cancer before the introduction of tyrosine kinase inhibitors and immunotherapy in the Republic of Croatia - a single institution study. *Acta Med Croatica*. 2021;75(2021):273-80.
6. Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske. Nacionalni program za probir i rano otkrivanje raka pluća 2020. - 2024. 2020. Dostupno s: <https://www.healthhub.hr/nacionalni-program-za-probir-i-rano-otkrivanje-raka-pluca-2020-2024/>
7. PlivaZdravlje. Provedba programa ranog otkrivanja raka pluća. 2023; Dostupno s: <https://www.plivazdravlje.hr/vijesti/clanak/36929/Provedba-programa-ranog-otkrivanja-raka-pluca.html>.
8. Feng RM, Zong YN, Cao SM, Xu RH. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? *Cancer Commun (Lond)*. 2019;39(1):22. Epub 20190429.
9. Mu L, Liu L, Niu R, Zhao B, Shi J, Li Y i sur. Indoor air pollution and risk of lung cancer among Chinese female non-smokers. *Cancer Causes Control*. 2013;24(3):439-50. Epub 20130112.
10. Shim J, Brindle L, Simon M, George S. A systematic review of symptomatic diagnosis of lung cancer. *Fam Pract*. 2014;31(2):137-48. Epub 20131217.
11. Vrdoljak E, Lovasić Belas I, Kusić Z, Grgić D, Juretić A. Klinička onkologija, 3. obnovljeno i izmijenjeno izdanje: Medicinska naklada; 2018.
12. Organisation WHO. 16. WHO Classification of Tumours, 5th Edition. Lyon: International agency for research on cancer; 2021. str. 19 - 189.
13. Kumar V AAK, Aster J.C. Robbins Basic Pathology. 10. izd. 2017.

14. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y i sur. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(5):668-84. Epub 20120912.
15. Rolfo C, Passiglia F, Ostrowski M, Farracho L, Ondøichová T, Dolcan A, Castiglia M, Remmen R, Papadimitriou K, Pauwels P. Improvement in lung cancer outcomes with targeted therapies: an update for family physicians. *J Am Board Fam Med.* 2015 Jan-Feb;28(1):124-33.
16. Moreira AL, Ocampo PSS, Xia Y, Zhong H, Russell PA, Minami Y i sur. A Grading System for Invasive Pulmonary Adenocarcinoma: A Proposal From the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. *J Thorac Oncol.* 2020;15(10):1599-610. Epub 20200617.
17. Kim HS, Mitsudomi T, Soo RA, Cho BC. Personalized therapy on the horizon for squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2013;80(3):249-55. Epub 20130313.
18. Sholl LM. Large-cell carcinoma of the lung: a diagnostic category redefined by immunohistochemistry and genomics. *Curr Opin Pulm Med.* 2014;20(4):324-31.
19. Wang Q, Gumus ZH, Colarossi C, Memeo L, Wang X, Kong CY i sur. SCLC: Epidemiology, Risk Factors, Genetic Susceptibility, Molecular Pathology, Screening, and Early Detection. *J Thorac Oncol.* 2023;18(1):31-46. Epub 20221012.
20. Rekhtman N. Lung neuroendocrine neoplasms: recent progress and persistent challenges. *Mod Pathol.* 2022;35(Suppl 1):36-50. Epub 20211018.
21. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE i sur. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(1):39-51.
22. Samaržija M JM, Boban M, Bošković L, Belac Lovasić I, Juretić A. Smjernice za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka pluća nemalih stanica. *Liječnički vijesnik.* 2017:11-2.
23. Sihoe ADL. Video-assisted thoracoscopic surgery as the gold standard for lung cancer surgery. *Respirology.* 2020;25 Suppl 2:49-60. Epub 20200730.
24. Mitchell JD. Techniques of VATS lobectomy. *J Thorac Dis.* 2013;5 Suppl 3(Suppl 3):S177-81.
25. Su G, Wang W, Xu L, Li G. Progress of EGFL6 in angiogenesis and tumor development. *Int J Clin Exp Pathol.* 2022;15(11):436-43. Epub 20221115.

26. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, Bharat A, Guidelines® Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 2.2023. *J Natl Compr Canc Netw*. 2023 Apr;21(4):340-350. doi: 10.6004/jnccn.2023.0020. PMID: 37015337.
27. Fuertes Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, Speiser DE. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol*. 2015;6:310. Epub 20150626.
28. Legat A, Speiser DE, Pircher H, Zehn D, Fuertes Marraco SA. Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells. *Front Immunol*. 2013;4:455. Epub 20131219.
29. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature*. 1993;362(6422):758-61.
30. Baitsch L, Baumgaertner P, Devereux E, Raghav SK, Legat A, Barba L i sur. Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2350-60. Epub 20110509.
31. Baitsch L, Fuertes-Marraco SA, Legat A, Meyer C, Speiser DE. The three main stumbling blocks for anticancer T cells. *Trends Immunol*. 2012;33(7):364-72. Epub 20120323.
32. Chen S, Crabill GA, Pritchard TS, McMiller TL, Wei P, Pardoll DM i sur. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):305. Epub 20191115.
33. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727-42. Epub 20200301.
34. Mallett G, Laurence A, Amarnath S. Programmed Cell Death-1 Receptor (PD-1)-Mediated Regulation of Innate Lymphoid Cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11). Epub 20190611.
35. Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Konishi I. Dual Faces of IFN $\gamma$  in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res*. 2016;22(10):2329-34. Epub 20160325.
36. Ikeda S, Okamoto T, Okano S, Umemoto Y, Tagawa T, Morodomi Y i sur. PD-L1 Is Upregulated by Simultaneous Amplification of the PD-L1 and JAK2 Genes in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(1):62-71.
37. Sui H, Ma N, Wang Y, Li H, Liu X, Su Y i sur. Anti-PD-1/PD-L1 Therapy for Non-Small-Cell Lung Cancer: Toward Personalized Medicine and Combination Strategies. *J Immunol Res*. 2018;2018:6984948. Epub 20180808.



38. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, Botling J i sur. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol*. 2018;13(9):1302-11. Epub 20180522.
39. Mueller-Pillasch F, Lacher U, Wallrapp C, Micha A, Zimmerhackl F, Hameister H i sur. Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene*. 1997;14(22):2729-33.
40. Chen L, Xie Y, Li X, Gu L, Gao Y, Tang L i sur. Prognostic value of high IMP3 expression in solid tumors: a meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2017;10:2849-63. Epub 20170606.
41. Findeis-Hosey JJ, Xu H. The use of insulin like-growth factor II messenger RNA binding protein-3 in diagnostic pathology. *Hum Pathol*. 2011;42(3):303-14. Epub 20101020.
42. Sun X, Wei P, Shen C, Yang Y, Wang Y, Li Y, et al. Prognostic value of the IASLC/ATS/ERS classification and IMP3 expression in lung adenocarcinoma of Chinese cases. *Am J Cancer Res*. 2015;5(7):2266-76. Epub 20150615.
43. Beljan Perak R, Durdov MG, Capkun V, Ivcevic V, Pavlovic A, Soljic V i sur. IMP3 can predict aggressive behaviour of lung adenocarcinoma. *Diagn Pathol*. 2012;7:165. Epub 20121128.
44. Vikesaa J, Hansen TV, Jonson L, Borup R, Wewer UM, Christiansen J i sur. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO J*. 2006;25(7):1456-68. Epub 20060316.
45. Zhao W, Lu D, Liu L, Cai J, Zhou Y, Yang Y i sur. Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3) promotes lung tumorigenesis via attenuating p53 stability. *Oncotarget*. 2017;8(55):93672-87. Epub 20170927.
46. Liu J, Liu Y, Gong W, Kong X, Wang C, Wang S i sur. Prognostic value of insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 and vascular endothelial growth factor-A in patients with primary non-small-cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2019;18(5):4744-52. Epub 20190910.
47. Burdelski C, Jakani-Karimi N, Jacobsen F, Moller-Koop C, Minner S, Simon R i sur. IMP3 overexpression occurs in various important cancer types and is linked to aggressive tumor features: A tissue microarray study on 8,877 human cancers and normal tissues. *Oncol Rep*. 2018;39(1):3-12. Epub 20171102.
48. Hong Y, Choi HM, Cheong HS, Shin HD, Choi CM, Kim WJ. Epigenome-Wide Association Analysis of Differentially Methylated Signals in Blood Samples of Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Med*. 2019;8(9). Epub 20190825.

49. Del Gobbo A, Morotti A, Colombo AE, Vaira V, Ercoli G, Pesenti C i sur. IMP3 expression in NSCLC brain metastases demonstrates its role as a prognostic factor in non-neuroendocrine phenotypes. *Med Oncol*. 2017;35(1):2. Epub 20171201.
50. Kim DW, Yun JS, Song SY, Na KJ. The Prognosis According to Patterns of Mediastinal Lymph Node Metastasis in Pathologic Stage IIIA/N2 Non-Small Cell Lung Cancer. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;47(1):13-9. Epub 20140205.
51. Bellezza G, Cavaliere A, Sidoni A. IMP3 expression in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol*. 2009;40(8):1205-6. Epub 20090508.
52. Zhang J, Ou Y, Ma Y, Zheng L, Zhang X, Xia R i sur. Clinical implications of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression in non-small cell lung carcinoma. *Oncol Lett*. 2015;9(4):1927-33. Epub 20150127.
53. Herbst RS, Baas P, Perez-Gracia JL, Felip E, Kim DW, Han JY i sur. Use of archival versus newly collected tumor samples for assessing PD-L1 expression and overall survival: an updated analysis of KEYNOTE-010 trial. *Ann Oncol*. 2019;30(2):281-9.
54. Miyazawa T, Marushima H, Saji H, Kojima K, Hoshikawa M, Takagi M i sur. PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer Including Various Adenocarcinoma Subtypes. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2019;25(1):1-9. Epub 20181003.
55. Igarashi T, Teramoto K, Ishida M, Hanaoka J, Daigo Y. Scoring of PD-L1 expression intensity on pulmonary adenocarcinomas and the correlations with clinicopathological factors. *ESMO Open*. 2016;1(4):e000083. Epub 20160826.
56. Zhang Y, Wang L, Li Y, Pan Y, Wang R, Hu H i sur. Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma. *Onco Targets Ther*. 2014;7:567-73. Epub 20140412.
57. Lin G, Fan X, Zhu W, Huang C, Zhuang W, Xu H i sur. Prognostic significance of PD-L1 expression and tumor infiltrating lymphocyte in surgically resectable non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8(48):83986-94. Epub 20170812.
58. Brambilla E, Le Teuff G, Marguet S, Lantuejoul S, Dunant A, Graziano S i sur. Prognostic Effect of Tumor Lymphocytic Infiltration in Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(11):1223-30. Epub 20160201.
59. Tancos V, Grendar M, Farkasova A, Hutka Z, Kviatkovska Z, Plank L. Programmed Death-Ligand 1 Expression in Non-Small Cell Lung Carcinoma Biopsies and Its Association with Tumor Infiltrating Lymphocytes and the Degree of Desmoplasia. *Klin Onkol*. 2020;33(1):55-65.

60. Inoue Y, Yoshimura K, Mori K, Kurabe N, Kahyo T, Mori H i sur. Clinical significance of PD-L1 and PD-L2 copy number gains in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(22):32113-28.
61. Ojlert AK, Halvorsen AR, Nebdal D, Lund-Iversen M, Solberg S, Brustugun OT i sur. The immune microenvironment in non-small cell lung cancer is predictive of prognosis after surgery. *Mol Oncol*. 2019;13(5):1166-79. Epub 20190410.
62. Shimizu K, Sugiura D, Okazaki IM, Maruhashi T, Takemoto T, Okazaki T. PD-1 preferentially inhibits the activation of low-affinity T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(35).
63. Mazzaschi G, Milanese G, Pagano P, Madeddu D, Gnetti L, Trentini F i sur. Dataset on the identification of a prognostic radio-immune signature in surgically resected Non Small Cell Lung Cancer. *Data Brief*. 2020;31:105781. Epub 20200602.
64. Takamori S, Takada K, Tagawa T, Toyokawa G, Hirai F, Yamashita N i sur. Differences in PD-L1 expression on tumor and immune cells between lung metastases and corresponding primary tumors. *Surg Oncol*. 2018;27(4):637-41. Epub 20180811.
65. Takamori S, Toyokawa G, Okamoto I, Takada K, Kozuma Y, Matsubara T i sur. Discrepancy in Programmed Cell Death-Ligand 1 Between Primary and Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. 2017;37(8):4223-8.
66. Xu H, Chen X, Lin D, Zhang J, Li C, Zhang D i sur. Conformance Assessment of PD-L1 Expression Between Primary Tumour and Nodal Metastases in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Onco Targets Ther*. 2019;12:11541-7. Epub 20191230.
67. Janzic U, Kern I, Janzic A, Cavka L, Cufer T. PD-L1 Expression in Squamous-cell Carcinoma and Adenocarcinoma of the Lung. *Radiol Oncol*. 2017;51(3):357-62. Epub 20170914.
68. Pawelczyk K, Piotrowska A, Ciesielska U, Jablonska K, Gletzel-Plucinska N, Grzegorzolka J i sur. Role of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance according to Clinicopathological Factors and Diagnostic Markers. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4). Epub 20190214.
69. Chitapanarux T, Gumrai P, Kongkarnka S, Wannasai K, Lertprasertsuke N. Programmed death-ligand 1 expression and overall survival in Thai patients with gastric cancer. *Sci Rep*. 2023;13(1):7241. Epub 20230504.
70. Saglam O, Zhou J, Wang X, Conejo-Garcia JR. PD-L1 Expression Correlates With Young Age and CD8+ TIL Density in Poorly Differentiated Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2020;39(5):428-35.

71. Rong L, Liu Y, Hui Z, Zhao Z, Zhang Y, Wang B i sur. PD-L1 expression and its clinicopathological correlation in advanced esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Diagn Pathol.* 2019;14(1):6. Epub 20190126.
72. Gu Y, Tang YY, Wan JX, Zou JY, Lu CG, Zhu HS i sur. Sex difference in the expression of PD-1 of non-small cell lung cancer. *Front Immunol.* 2022;13:1026214. Epub 20221020.
73. Wei XL, Luo X, Sheng H, Wang Y, Chen DL, Li JN i sur. PD-L1 expression in liver metastasis: its clinical significance and discordance with primary tumor in colorectal cancer. *J Transl Med.* 2020;18(1):475. Epub 20201211.
74. Jiang T, Shi J, Dong Z, Hou L, Zhao C, Li X i sur. Genomic landscape and its correlations with tumor mutational burden, PD-L1 expression, and immune cells infiltration in Chinese lung squamous cell carcinoma. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):75. Epub 20190712.
75. Zhang Y, Li J, Wang R, Li Y, Pan Y, Cai D i sur. The prognostic and predictive value of solid subtype in invasive lung adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2014;4:7163. Epub 20141124.

## **10. KRATKI ŽIVOTOPIS**

**Ime i prezime:** Ivan Šimundža

**Adresa:** Klinika za kirurgiju, Zavod za torakalnu i vaskularnu kirurgiju, Odjel za torakalnu kirurgiju, KBC Split, Spinčićeva 1, 21 000 Split

**Datum rođenja:** 7. rujna 1987.

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Nacionalnost:** Hrvat

**Obitelj:** oženjen, otac troje djece

**Obrazovanje:**

2002. – 2006. Matematička gimnazija Split

2006. – 2012. Medicinski fakultet Split

2013. Stručni ispit doktora medicine

2020. Specijalistički ispit iz kardiorakalne kirurgije (smjer torakalna kirurgija) – KBC Zagreb, Klinika za plućne bolesti Jordanovac

**Zaposlenje:**

2014. – Zavod za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije, hitna helikopterska služba

2015. – Klinika za kirurgiju, Zavod za torakalnu i vaskularnu kirurgiju, Odjel za torakalnu kirurgiju, KBC Split

**Poslijediplomski studij:**

2017. – 2023. Poslijediplomski doktorski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, “Biologija novotvorina”

**Članstvo u stručnim organizacijama:**

European Society of Thoracic Surgery (ESTS)

European Association for Cardiothoracic Surgery (EACTS)

Hrvatsko društvo za endoskopsku kirurgiju (HDEK)

Hrvatsko torakalno društvo (HTD)

Hrvatsko društvo za torakalnu kirurgiju

**Stručna izlaganja:**

VATS timektomija u liječenju miastenije gravis” – 13. kongres Hrvatskog društva za endoskopsku kirurgiju. Tuhelj, 2016.

“Mikrolobektomija u liječenju karcinoma pluća” – 14. kongres Hrvatskog društva za endoskopsku kirurgiju. Pula, 2018.

**Kongresni sažetci publicirani u časopisima:**

Ilic N, Juricic J, Krnic D, Orsulic D, **Simundza I**, Urlic M, Frleta Ilic N, Ilic D. Uniportal VATS lobectomy in treatment of NSCLC. Journal of Thoracic Oncology. 2017; 2. suppl.

Oršulić D, **Simundza I**. The power of sentinel node in non- small cell lung cancer uniport video assisted thoracoscopic surgery. Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery.2017; 25. suppl. 1.

Ilic N, Ilic D, Orsulic D, **Simundza I**, Ilic Frleta N. Intubated versus non-intubated anaesthesia for lung cancer VATS in octogenarians. Journal of Thoracic Oncology. 2017; 12: 11 suppl. 2.

**Stručni i originalni znanstveni članci:**

Jukica L, Sekovski B, **Šimundža I**, Mladinov S, Čapkun V, Glavina-Durdov M. Analiza općeg preživljenja bolesnika s karcinomom pluća prije uvođenja inhibitora tirozin kinaze i imunoterapije u Republici Hrvatskoj – studija iz jedne ustanove. Acta Medica Croatica. 2021;75;273–80.

**Simundza I**, Krnic D, Juricic J, Benzon B, Simundza R, Stanicic IM, Capkun V, Vukojevic K, Glavina Durdov M. Expression of PD-L1 is associated with inflammatory microenvironment in surgical specimens of non-small cell lung aancer. J Pers Med. 2021;11: 767.