Ekspresija liganda 1 programirane smrti stanice u bolesnika sa ne sitno staničnim karcinomom pluća: povezanost s kliničko-patološkim značajkama i molekularnim promjenama

Lončar, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:934693

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE

Ana Lončar

EKSPRESIJA LIGANDA 1 PROGRAMIRANE SMRTI STANICE U BOLESNIKA SA NESITNOSTANIČNIM KARCINOMOM PLUĆA: POVEZANOST S KLINIČKO-PATOLOŠKIM ZNAČAJKAMA I MOLEKULARNIM PROMJENAMA

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE

Ana Lončar

EKSPRESIJA LIGANDA 1 PROGRAMIRANE SMRTI STANICE U BOLESNIKA SA NESITNOSTANIČNIM KARCINOMOM PLUĆA: POVEZANOST S KLINIČKO-PATOLOŠKIM ZNAČAJKAMA I MOLEKULARNIM PROMJENAMA

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Rad je ostvaren pri Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu u Kliničkom bolničkom centru Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Ksenija Marjanović, dr. med.

Rad ima 36 stranica, 16 tablica i 8 slika.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Kseniji Marjanović, dr. med. na savjetima i pomoći koju mi je pružila pri pisanju diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem profesorici Kristini Kralik na statističkoj obradi rada.

Zahvaljujem roditeljima Branki i Tinu za potporu koju su mi pružali tijekom svih godina studiranja.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA II
1. UVOD 1
1.1. Epidemiologija i etiologija karcinoma pluća 1
1.2. Dijagnostika i patohistološka klasifikacija karcinoma pluća 2
1.2.1. Dijagnostički postupci u bolesnika sa karcinomom pluća 2
1.2.2. Procjena proširenosti bolest 2
1.2.3. Patohistološka klasifikacija karcinoma pluća 3
1.3. Imunobiologija tumora 4
1.3.1. Imunosne kontrolne točke i inhibitori imunosnih kontrolnih točaka PD-1/PD-L1 4
1.3.2. Inhibitori imunosnih kontrolnih točaka PD-1/PD-L1 5
2. HIPOTEZA: 7
3. CILJEVI: 8
4. ISPITANICI I METODE 9
4.1. Ustroj studije 9
4.2. Ispitanici 9
4.3. Metode 9
4.3.1. Imunohistokemija PD-L1 10
4.4. Statističke metode 11
5. REZULTATI 13
6. RASPRAVA 22
7. ZAKLJUČAK 27
8. SAŽETAK 28
9. ABSTRACT 29
10. LITERATURA 30
11. ŽIVOTOPIS 35

POPIS KRATICA

ALK – anaplastična limfomska kinaza (prema engl. *anplastic lymphoma kinase*)

ADC – adenokarcinom (prema engl. *adenocarcinoma*)

CT – kompjuterizirana tomografija (prema engl. *computed tomography*)

EGFR – receptor epidermalnog čimbenika rasta (prema engl. *epidermal growth factor receptor*)

IHC – imunohistokemija (prema engl. *immunohistochemistry*)

LCC – karcinom velikih stanica (prema engl. *large cell carcinoma*)

NSCLC – nesitnostanični karcinom pluća (prema engl. *non small lung cell carcinoma*)

PD-1 – protein 1 programirane smrti stanice (prema engl. *programmed cell death 1 protein*)

PD-L1 – ligand 1 programirane smrti stanice (prema engl. *programmed cell death 1 ligand 1*)

ROS1 – ROS protoonkogen 1 (prema engl. *ROS Proto-Oncogene 1*)

SCLC – sitnostanični karcinom pluća (prema engl. *small cell lung carcinoma*)

SCC – skvamozni karcinom (prema engl. *squamous cell carcinoma*)

1. UVOD

1.1. Epidemiologija i etiologija karcinoma pluća

Prema podacima Hrvatskoga zavoda za javno zdravstvo procjenjuje se da će u Hrvatskoj 2020. godine biti dijagnosticiran 25001 novi slučaj malignih bolesti (13499 muškaraca i 11502 žene), od kojih će umrijeti 14216 osoba (8129 muškaraca i 6087 žena). Kao vodeći zloćudni uzrok smrti ističe se karcinom pluća (2984 smrti) (1). Karcinom pluća je ujedno i jedan od vodećih javnozdravstvenih problema u Hrvatskoj. Svake se godine otkrije više od 3000 novih slučajeva, a gotovo isti broj bolesnika od ove bolesti i umire. Stoga je u siječnju 2020. godine donešen Nacionalni programa za probir i rano otkrivanje karcinoma pluća 2020. – 2024. kojem je cilj dijagnosticirati bolest u ranijim stadijima bolesti, kada su mogućnosti liječenja veće kao i ukupno preživljenje. Bolesnici se najčešće dijagnosticiraju u proširenom stadiju bolesti kada veličina tumora seže čak i do deset centimetara a najčešće su već prisutne i metastaze (2). Petogodišnje preživljenje od karcinoma pluća u Hrvatskoj iznosi 10 %, što nas pozicionira na samo dno ljestivce europskih zemalja (3).

Prema podacima Hrvatskoga registra za rak za 2016. godinu u Republici Hrvatskoj je od karcinoma pluća oboljelo ukupno 3068 osoba od čega 904 žene i 2164 muškaraca. Prema posljednjim podacima o mortalitetu u 2018. godini je od karcinoma pluća umrlo 2957 osoba, od toga 860 žena i 2097 muškaraca (4). Posljednje procjene GLOBOCAN-a za Hrvatsku su da je u 2018. godini od karcinoma pluća oboljela 3021 osoba (stopa incidencije 72,5/100 000), od čega 899 žena (stopa incidencije 41,7/100 000) i 2122 muškarca (stopa incidencije 105,7/100 000). Incidencija (i mortalitet) kod muškaraca stagniraju ili su u blagom padu dok se kod žena prati porast incidencije i mortaliteta što je povezano s porastom prevalencije pušenja među ženama (2, 5).

Pušenje je glavni rizični faktor za nastanak karcinoma pluća, u anamnezi ga navodi 80–90 % bolesnika. Početkom prošlog stoljeća karcinom pluća je bio relativno rijetka bolest. Uzročna povezanost pušenja i ove bolesti po prvi put je dokazana velikim istraživanjem engleskih liječnika R. Dolla i A. Bradforda Hilla sredinom prošlog stoljeća (6). Ostali rizični faktori su: podatak o bliskom srodniku oboljelom od karcinoma pluća, dijagnosticirana druga maligna bolest, kronična opstruktivna plućna bolest i izloženost kancerogenim tvarima. Najčešći simptomi karcinoma pluća su: kašalj, dispneja, hemoptize, ponavljajuće upale pluća, gubitak tjelesne težine i bol u prsištu (7).

1.2. Dijagnostika i patohistološka klasifikacija karcinoma pluća

1.2.1. Dijagnostički postupci u bolesnika sa karcinomom pluća

Prema Smjernicama za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od nesitnostaničnog karcinoma pluća Hrvatskoga onkološkoga društva Hrvatskoga liječničkog zbora u obradi bolesnika sa sumnjom na karcinom pluća, provode se uz anamnezu, fizikalni pregled i obaveznu rendgensku snimku pluća još i biokemijske analize, CT toraksa (engl. *computed tomography*) i gornjeg abdomena. Sa ciljem dobivanja uzoraka za citološku i patohistološku analizu provode se citološka analiza iskašljaja, bronhoskopija s aspiracijom, četkanjem bronha i biopsijom. Ukoliko se radi o periferno smještenim tumorima provodi se transtorakalna biopsija (ako nije moguća, onda punkcija) pod kontrolom CT-a ili ultrazvuka. Pleuralni izljev se obavezno evakuira i citološki analizira. Patohistološka dijagnoza se postavlja na uzorcima tkiva koji su najčešće dobiveni tijekom bronhoskopija ili transtorakalne biopsije pod kontrolom CT-a ili ultrazvuka. Citološka se dijagnoza postavlja na razmazima iskašljaja, uzorcima dobivenim tijekom bronhoskopije (obrisak četkicom, otisak ekscidirane sluznice, ispirak bronha i aspirat), transbronhalnom i transtorakalnom punkcijom. Klasifikacija histološkog tipa na citološkom i patohistološkom (biopsija, ekstirpacija tumora) materijalu ima odlučujuću ulogu u odabiru terapije i prognozi (8).

1.2.2. Procjena proširenosti bolest

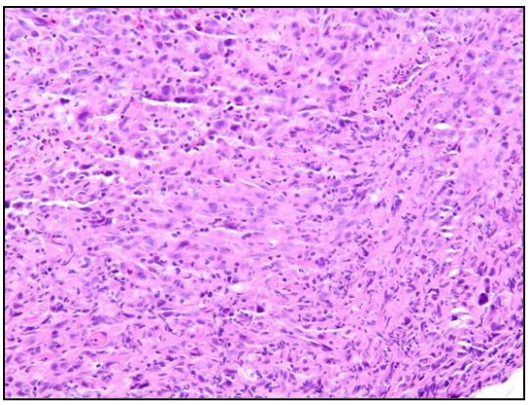
Dijagnostički postupci neophodni za procjenu proširenosti bolesti su: CT toraksa i gornjeg abdomena, u bolesnika sa sumnjom na koštane metastaze scintigrafija kosti, rendgenska snimka kosti ako su prisutni simptomi ili patološki scintigrafski nalaz. Ukoliko su prisutni simptomi metastaze u mozgu provodi se CT mozga s kontrastom ili MR, a pleuralni izljev se, ako je prisutan, evakuira i citološki analizira. Povećani limfni čvorovi u području glave, vrata i grudnog koša se mogu citološki punktirati i analizirati. Uz pomoić endobronhalnog i transezofagealnog ultrazvuka punktiraju se medijastinalni limfni čvorovi (8).

Za procjenu proširenosti nesitnostaničnog karcinoma pluća (engl. *non small lung cell carcinoma- NSCLC*) koristi se TNM klasifikacija (engl. *tumor-nodus metastasis*; tumor-čvor-metastaza): T (tumor) – odnosi se na veličinu i raširenost primarne tumorske mase, N (limfni čvorovi) – ukazuje na prisutnost ili odsutnost metastaza u limfnim čvorovima i M (metastaze) – ukazuje na prisutnost ili odsutnost udaljenih metastaza (9). Klinički se samo mali dio

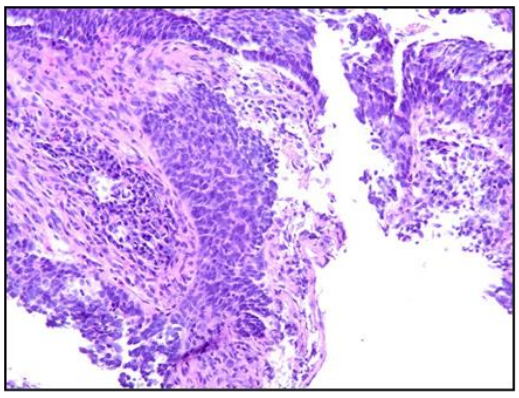
bolesnika s NSCLC dijagnosticira u ranoj fazi (stadij I ili II), kada se tumor može liječiti kirurškom resekcijom. Većina (više od 60 %) bolesnika s karcinomom pluća u trenutku dijagnoze ima lokalno uznapredovalu ili metastatsku bolest (stadij III ili IV), kada kirurška resekcija najčešće nije opcija (10).

1.2.3. Patohistološka klasifikacija karcinoma pluća

Tradicionalna podjela karcinoma pluća uključivala je dvije velike grupe: nesitnostanični karcinom i karcinom sitnih stanica (engl. *small cell carcinoma, SCLC*). Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća ovi su dijagnostički pojmovi, zbog ograničenih mogućnosti liječenja koje obično nisu trebale daljnju morfološku subklasifikaciju, bili najčešće korišteni. Karcinom pluća je heterogena skupina tumora, koja se sastoji od više od 50 histomorfoloških podtipova, a prepoznavanje različitosti NSCLC-a rezultiralo je 2015. godine subklasifikacijom Svjetske Zdravstvene Organizacije (engl. *World Health Organisation, WHO*) koja karcinom pluća dijeli na SCLC (15-20 % bolesnika) i NSCLC (75-80 % bolesnika). Nesitnostanični karcinomi uključuju adenokarcinom (engl. *adenocarcinoma, ADC*) (Slika 1.), skvamozni karcinom (engl. *squamous cell carcinoma, SCC*) (Slika 2.) i karcinom velikih stanica (engl. *large cell carcinoma, LCC*) (11, 12).



Slika 1. Adenokarcinom pluća. Hematoksilin-eozion, 200X



Slika 2. Skvamozni karcinom pluća. Hematoksilin-eozin, 200X

Izvor: Zavod za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek, arhivski materijal.

Tijekom posljednja dva desetljeća otkriven je niz mutacija uključenih u rast tumora koje se nalaze u bolesnika s NSCLC-om. Radi se o višestrukim genskim promjenama u procesu

onkogeneze a koje su gotovo isključivo vezane uz adenokarcinom. Značaj mutacija gena iz obitelji tirozin kinaznih receptora, kao što su receptor za epidermalni čimbenik rasta (engl. *epidermal growth factor receptor, EGFR*) i anaplastični limfom-kinazni receptor (engl. *anplastic lymphoma kinase, ALK*) dovelo je do razvoja novih terapijskih mogućnosti, lijekova koji blokiraju pojedine tirozinske receptore čija primjena rezultira boljim preživljenjem bolesnika sa adenokarcinomom pluća koji su pozitivni na navedene mutacije. Princip nastanka fuzijskog gena kod ROS1 (engl. *ROS Proto-Oncogene 1*) translokacije isti je kao i kod ALK translokacije, pa se i principi liječenja tih bolesnika temelje na istim principima kao i liječenje bolesnika s ALK pozitivnim karcinomima (13). Razumijevanje uloge mutacije gena EGFR i mutacije gena ALK u NSCLC-u pokazali su se ključnim u poboljšanju liječenja ovih bolesnika. Osim toga, identificiran je širok spektar drugih važnih genetskih pokretača, što je dovelo do razvoja širokog spektra ciljanih lijekova koji su poboljšali ishode liječenja.

1.3. Imunobiologija tumora

Najveći napredak u liječenju karcinoma pluća posljednjih se desetak godina temelji na istraživanjima uloge imunosnog sustava u karcinogenezi. Uloga je imunosnog sustava da neprestano nadgleda situaciju u ljudskom organizmu i uklanja stanice koje ga ugrožavaju, poput mikroorganizma ili vlastitih oštećenih ili maligno promijenjenih stanica. Nobelova nagrada za medicinu 2018. godine dodijeljena je Allisonu i Honjou, dvojica znanstvenika koji su neovisno jedan od drugog radeći na imunobiologiji tumora, objasnili aktivaciju i utišavanje molekularnih mehanizama kojima imunosni sustav prepoznaje i uklanja stanice tumora (14).

1.3.1. Imunosne kontrolne točke i inhibitori imunosnih kontrolnih točaka PD-1/PD-L1

Istraživanje mikrookoliša tumora je dovelo do otkrića niza molekula nazvanih "imunosne kontrolne točke" koje mogu promijeniti sposobnost imunosnog sustava da prepozna maligne stanice. Imunosne kontrolne točke sastoje se od skupa receptora na površini aktiviranih T stanica. Ometajući aktivaciju T stanica, molekule imunoloških kontrolnih točaka osiguravaju imunološku homeostazu i samotoleranciju u „normalnim“ fiziološkim uvjetima, pri čemu se izbjegava kolateralno oštećenje tkiva. U zloćudnoj bolesti, klinička inhibicija ovih kontrolnih točaka oslobađa inhibitorne "kočnice", blokira inhibitorno djelovanje kontrolne točke i ponovno aktivira imunološki sustav da pokrene napad na tumorske stanice. Ovaj je mehanizam opisan s više od 20 poznatih modulatora među kojima je i receptor programirane stanične smrti 1 (engl. *programmed cell death 1 protein, PD-1*) (15).

1.3.2. Inhibitori imunosnih kontrolnih točaka PD-1/PD-L1

PD-1, protein 1 programirane stanične smrti (engl. *programmed cell death 1 protein*) proteinski je receptor koji se nalazi na površini aktiviranih T stanica, makrofaga, B stanica i NK stanica, pri čemu je njegova povećana aktivacija uočena kao odgovor na kronični podražaj s antigenom koji je prisutan kod malignih bolesti ili kroničnih virusnih infekcija (15). PD-1 ima dva liganda PD-L1 i PD-L2. PD-L1 (engl. *programmed cell death 1 ligand 1*) - ligand 1 programirane stanične smrti se nalazi na površini tumorskih stanica, veže se za PD-1 receptor T stanice, inhibira ga te tako sprječava stanice imunosnog sustava da ju napadnu (16, 17).

Cilj imunoterapije karcinoma jest onemogućiti kontakt PD-L1 liganda tumorske stanice sa PD-1 receptorm te na taj način spriječiti inhibiciju T limfocita i aktivirati antitumorsko djelovanje imunosnog sustava – pojačati imunosni odgovor protiv karcinoma. Tako su stvoreni PD-1 i PD-L1 inhibitori - blokatori PD-1 molekule nivolumab i pembrolizumab te blokatori PD-L1 atezolizumab, durvalumab i avelumab. Njima je moguće postići trajniju remisiju u bolesnika sa karcinomom pluća ne malih stanica, a objektivan je klinički odgovor usko povezan sa imuno histokemijskom (engl. *immunohistochemistry, IHC*) ekspresijom PD-L1 u stanicama tumora (18).

U eri precizne medicine, IHC igra presudnu ulogu u klasifikaciji tumora u podtipove i za procjenu biomarkera kojima je cilj pravovremeno donošenje odgovarajućih terapijskih odluka (19). U usporedbi s drugim tehnikama, IHC ima brojne prednosti, široko je dostupna, tehnički nezahtjevna i isplativa uz kratko vrijeme obrade. Molekularno specifični IHC testovi imaju ogroman potencijal kao praktični alat za probir u otkrivanju genetskih promjena koje se mogu liječiti i za procjenu biomarkera pogodnih za molekularno ciljanu terapiju. Uz to, za IHC je interpretaciju potrebno manje tumorskih stanica nego je to potrebno za druge molekularne tehnike (20).

PD-L1 kao tumorski marker predstavlja biološki kontinuum ekspresije proteina od vrlo niskih preko umjerenih do vrlo visokih razina. Trenutno je IHC glavna metoda za identificiranje ekspresije PD-L1 u kirurški odstranjenim ili biopsijom dobivenim uzorcima kod bolesnika sa NSCLC. Rezultat IHC procjene je definiran kao udio tumorskih stanica ili tumorskih i imunih stanica koje su PD-L1 obojene metodama IHC (21). Izravna procjena ekspresije PD-L1 na stanicama tumora omogućuje nam predviđanje odgovora na liječenje inhibitorima PD-1/PD-L1 – procjenom ekspresije PD-L1 moguće je ustanoviti koji bolesnici imaju veću vjerojatnost da će odgovoriti na imunoterapiju, ali i negativni bolesnici mogu odgovoriti na liječenje.

Imunoterapija je učinila značajne pomake u poboljšanju preživljenja bolesnika s karcinomom pluća koji nisu kandidati za ciljanu terapiju (22).

Istraživanja korelacije IHC ekspresije PD-L1 i odgovora na inhibiciju imunosne kontrolne točke (23, 24) rezultiralo je saznanjima da ona ovisi o histološkom tipu tumora, o primjeni različitih (nestandardiziranih) IHC tehnika, primjeni različitih sustava bodovanja (engl scoring systems) i različito postavljenim graničnim vrijednostima pozitivnosti (engl. *cut offs*). Stoga su i istraživanja jednih pokazala povezanost ekspresije PD-L1 i bolje prognoze, drugi su je povezali sa lošijom prognozom, a bilo je i istraživanja u kojih ekspresija PD-L1 nije imala prognostički značaj. Pozitivna ekspresija PD-L1 češće je viđena kod SCC i drugih histoloških tipova NSCLC u usporedbi s ADC. A u ADC, ekspresija PD-L1 bila je povezana s statusom pogonskih mutacija (pozitivnom EGFR translokacijom) (25).

Za različite inhibitore PD-1/PD-L1 dizajnirani su specifični IHC testovi kojima je moguće procijeniti hoće li testirani bolesnici biti kandidati za terapiju inhibitorima kontrolnih točaka (26). Trenutno postoji pet različitih PD-1/PD-L1 inhibitora koji zahtijevaju specifične IHC testove a koji koriste različita PD-1/PD-L1 antitijela (nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab i avelumab) (20).

Tretmani za pacijente s uznapredovalim NSCLC-om su palijativni i imaju za cilj produljiti preživljenje i očuvati kvalitetu života što je dulje moguće, uz minimiziranje nuspojava zbog liječenja. Inhibitori imunosne kontrolne točke koji ciljaju ili programirani protein stanične smrti 1 (PD-1) ili programirani ligand stanične smrti 1 (PD-L1) postali su rutinski dio kliničkog pristupa bolesnicima sa NSCLC.

2. HIPOTEZA

Detekcija umjerene i jake ekspresije PD-L1 (1–49 % i ≥ 50 %) češća je u skvamoznom karcinomu pluća u odnosu na adenokarcinom pluća.

3. CILJEVI

1. Ispitati povezanost ekspresije PD-L1 sa histološkim/citološkim podtipovima NSCLC

2. Ispitati povezanost espresije PD-L1 s demografskim (spol, dob) i kliničkim obilježjima (navika pušenja cigareta, stadij bolesti)

3. Ispitati povezanost espresije PD-L1 s nalazom molekularnih testiranja (EGFR, ALK, ROS 1) nesitnostaničnog karcinoma pluća

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je bilo ustrojeno kao presječno istraživanje (27).

4.2. Ispitanici

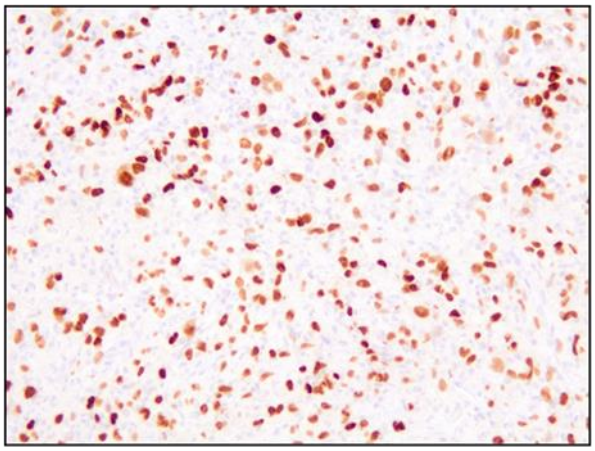
U istraživanje su bili uključeni ispitanici čiji su bronhoskopski uzorci, uzorci pleuralnog izljeva, uzorci dobiveni transtorakalnom punkcijom tankom iglom, transtorakalnom biopsijom i uzorci dobiveni kirurškom resekcijom tumora pregledani u Kliničkom zavodu za kliničku citologiju i Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek, u razdoblju od 1. siječnja 2019. godine do 31. prosinca 2020. godine, te im je bila postavljena citološka (28) i/ili patohistološka dijagnoza nesitnostaničnog karcinoma pluća (12).

Iz računalne baze podataka Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu i Kliničkog zavoda za kliničku citologiju KBC Osijek bili su izdvojeni patohistološki i citološki podaci, a klinički podaci (navika pušenja duhana/pušački status, stadij bolesti) su bili prikupljeni pretraživanjem medicinske dokumentacije bolesnika iz računalne baze podataka KBC Osijek. Uveden je sustav šifriranja prema kojemu nije moguće utvrditi identitet osobe čiji su anamnestički podaci korišteni u daljnjem tijeku istraživanja. Obrada podataka u ovom istraživanju nije ni na koji način utjecala na dijagnozu i liječenje bolesnika čiji su podaci korišteni u istraživanju. Iz istraživanja su bili isključeni ispitanici kojima je postavljena citološka i/ili patohistološka dijagnoza sitnostaničnog karcinoma pluća. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku, 5. svibnja 2021. godine. (Klasa: 602 – 04 / 21 – 08 / 07, Broj: 2158 – 61 – 07 – 21 - 91.

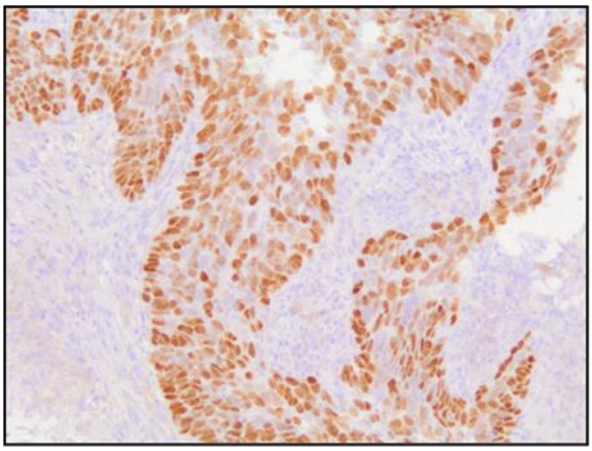
4.3. Metode

Ispitanicima su bili zabilježeni podatci o: dobi (godine), spolu, citološkom i/ili patohistološkom tipu karcinoma pluća, navici pušenja duhana/pušačkom statusu i stadiju proširenosti bolesti. Citološka dijagnoza je bila postavljena analizom bronhoskopski dobivenih razmaza (četkanjem bronha, otiskom ekscidirane sluznice), razmazima dobivenim transtorakalnom punkcijom ili sedimentima pleuralnog izljeva. Citološki uzorci su bili fiksirani sušenjem na zraku i standardno bojeni metodom po May Grünwald Giemsi. Pri citološkoj subklasifikaciji nesitnostaničnog karcinoma bila su korištena slijedeća imunocitokemijska protutijela: TTF-1, p40, CK5/6, CD56. Patohistološka dijagnoza bila je postavljena na bioptičkom ili resekcijskom

materijalu fiksiranom u formalinu, uklopljenom u parafinske kocke, bojenom standardnim hemalaun eozin bojenjem i dodatnim imunohistokemijskim metodama, a u skladu s važećom klasifikacijom Svjetske zdravstvene organizacije (12). Za potvrdu patohistološke dijagnoze bila su korištena slijedeća protutijela: za adenokarcinom TTF-1 (Slika 1.) i Napsin A, a za skvamozni karcinom p63, p40 (slika 2.) i CK5/6.



Slika 3. Adenokarcinom pluća, TTF-1 pozitivan, 200X



Slika 4. Skvamozni karcinom pluća, p40 pozitivan, 200X

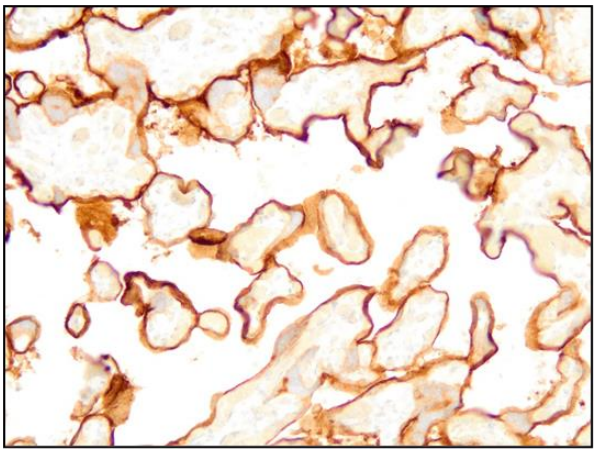
Izvor: Klinički zavod za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek, arhivski materijal).

4.3.1. Imunohistokemija PD-L1

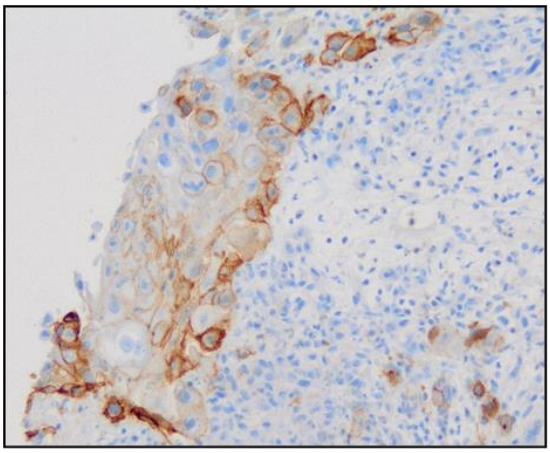
Imunohistokemijsko bojenje bilo je provedeno u automatiziranom uređaju Benchmark proizvođača Ventana (Roche). Za određivanje prisutnosti PD-L1 proteina bilo je korišteno primarno protutijelo proizvođača Ventana (Roche) anti-PD-L1 (klon SP263, rabbit monoclonal primary antibody). Ekspresija PD-L1, temeljila su se na Priručniku za interpretaciju PD-L1 (SP263) kita za bojenje NSCLC 2017 (Roche, Basel, Switzerland). Analiza je uzimala u obzir ukupni postotak pozitivnih neoplastičnih stanica u uzorku bilo kojeg intenziteta iznad mogućeg uočenog pozadinskog bojenja, koji je pokazivao uzorak obojenja membrane (obodni, diskontinuirani ili bazolateralni). Kao pozitivna kontrola bilo je korišteno tkivo posteljice kod koje je bilo izraženo jednoliko membransko obojenje i umjereno citoplazmatsko obojenje stanica trofoblasta (Slika 3.). Pozitivnost u imunološkim stanicama nije bila uzimana u obzir pri određivanju ukupnog bodovanja (engl. *scoring)*

Ekspresija PD-L1 proteina bila je određena upotrebom TPS-a (engl. *tumor proportion score*), koji predstavlja udio očuvanih tumorskih stanica a koje pokazuju djelomično ili potpuno

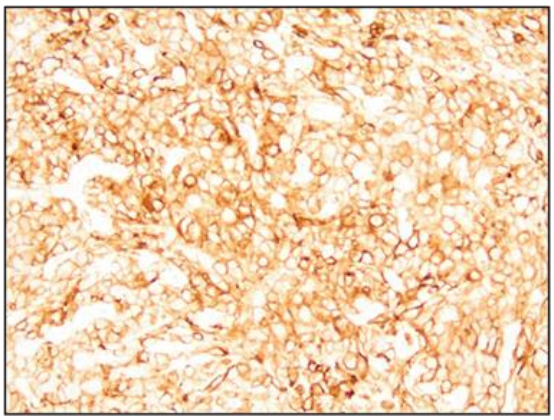
membransko bojenje bilo kojeg intenziteta. Smatra se da je uzorak negativan ili pozitivan za nalaz ekspresije PD-L1 pri TPS < 1 %, odnosno TPS > 1 %. Ekspresija PD-L1 bila je podrazvrstana kao niska ekspresija PD-L1 s TPS < 1 %, umjerena ekspresija TPS 1–49 % (Slika 4.) i visoka ekspresija PD-L1 s TPS ≥ 50 % (Slika 5. i 6.).



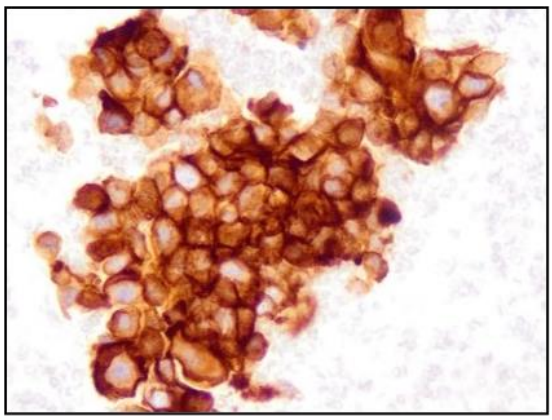
Slika 5. Pozitivna kontrola.
Tkivo posteljice, 200X



Slika 6. PD-L1 5 %. Skvamozni karcinom.
Biopsija, 200X



Slika 7. PD-L1 50 %. Adenokarcinom.
Biopsija, 200X



Slika 8. PD-L1 95 %. Adenokarcinom.
Stanični blok, 200X

Izvor: Klinički zavod za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek, arhivski materijal.

4.4. Statističke metode

Kategorijski podatci bili su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike u kategorijskim varijablama bile su testirane Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost

raspodjele kontinuiranih varijabli bila je testirana Shapiro - Wilkovim testom. Zbog raspodjele numeričkih podataka koje ne slijede normalnu razdiobu numerički podatci bili su opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona, a za testiranja su bile korištene neparametrijske metode. Razlike numeričkih varijabli između dvije nezavisne skupine bile su testirane Mann Whitneyevim U testom (29). Sve P vrijednosti su bile dvostrane. Razina značajnosti je bila postavljena na Alpha = 0,05. Za statističku analizu bio je korišten statistički program MedCalc® Statistical Software version 19.6 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; https://www.medcalc.org; 2020) i IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp.Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

5. REZULTATI

U razdoblju od 1. siječnja 2019. godine do 31. prosinca 2020. godine u Kliničkom zavodu za kliničku citologiju su pregledani bronhoskopski uzorci 1342 bolesnika i uzorci transtorakalnih punktata 247 bolesnika, te je kod njih 291 (18,3 %) postavljena dijagnoza karcinoma pluća. Primjenom metoda imunocitokemije i imunohistokemije kod 203 (69,7 %) ispitanika je postavljena dijagnoza NSCLC. Testiranje ekspresije PD-L1 provedeno je na 172/203 (84,7 %) 120 (69,8 %) muškaraca i 52 (32,2 %) žene. Medijan dobi ispitanika je 66 godina (interkvartilnog raspona od 61 do 72 godine) u rasponu od 35 do 83 godine (Tablica 1.).

Tablica 1.

	Median (interkvartilni raspon) dobi	Hodges-Lehmannova razlika medijana	95 % raspon pouzdanosti	P*
Muškarci Žene	66 (62 – 72) 64 (59 – 71)	-2	-5 do 0	0,09

*Mann Whitney U test

Umjerenu i jaku ekspresija PD-L1 ima 57 (66 %) muškaraca i 29 (34 %) žena. Iako ekspresiju PD-L1 ≥ 50 % imaju nešto više žene, njih 9 (31 %), razlika u ekspresiji pozitivnih PD-L1 nalaza u odnosu na spol nije značajna (Tablica 2.).

Tablica 2. Umjerena i jaka ekspresija PD-L1 prema spolu

	Broj (%) po spolu			P*
	Muškarci	Žene	Ukupno	
1 – 49	42 (73,7)	20 (69)	62 (72,1)	0,80
≥ 50	15 (26,3)	9 (31)	24 (27,9)	
Ukupno	57 (100)	29 (100)	86 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Nešto su stariji ispitanici (od 70 i više godina) koji imaju ekspresiju PD-L1 ≥ 50 %, no ta razlika nije značajna u odnosu na mlađe ispitanike (Tablica 3.).

Tablica 3. Umjerena i jaka ekspresija PD-L1 po dobnim skupinama

	Broj (%) po ekspresiji PD-L1			P*
Dob	1 - 49	≥ 50	Ukupno	
30 – 39	1 (1,6)	0	1 (1,2)	0,58
40 – 49	1 (1,6)	0	1 (1,2)	
50 – 59	11 (17,7)	6 (25)	17 (19,8)	
60 – 69	32 (51,6)	8 (33,3)	40 (46,5)	
70 – 79	14 (22,6)	8 (33,3)	22 (25,6)	
80 – 89	3 (4,8)	2 (8,3)	5 (5,8)	
Ukupno	62 (100)	24 (100)	86 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Ekspresija PD-L1 (< 1 %) nije nađena kod 86 (50 %) ispitanika, jaku ekspresiju (≥ 50 %) imala su 24 (14 %) ispitanika, a umjerenu (1 – 49 %) njih 62 (36 %). Nema značajnih razlika u ekspresiji PD-L1 prema tipu tumora (Tablica 4.).

Tablica 4. Ekspresija PD-L1 prema tipu tumora

	Broj (%) po ekspresiji PD-L1				P*
	< 1	1 - 49	≥ 50	Ukupno	
Adenokarcinom	43 (50)	31 (50)	15 (62,5)	89 (52)	0,19
Skvamozni	36 (41,9)	20 (32,3)	5 (20,8)	61 (35)	
NOS tip karcinoma	7 (8,1)	9 (14,5)	4 (16,7)	20 (12)	
Adenoskvamozni	0	2 (3,2)	0	2 (1)	
Ukupno	86 (100)	62 (100)	24 (100)	172 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Također, nema niti značajnih razlika u umjerenoj i jakoj ekspresiji PD-L1 prema tipu tumora, te raspodjele ispitanika prema dobi i vrsti tumora posebno u skupni ispitanika s ekspresijom PD-L1 od 1 – 49 % i u skupini ispitanika s ekspresijom PD-L1 ≥ 50 % (Tablica 5., Tablica 6., Tablica 7.).

Tablica 5. Raspodjela ispitanika s umjerenom i jakom ekspresijom PD-L1 po tipu tumora

	Broj (%) po pozitivnoj ekspresiji PD-L1			P*
	1 - 49	≥ 50	Ukupno	
Adenokarcinom	31 (50)	15 (62,5)	46 (53,5)	0,58
Skvamozni	20 (32,3)	5 (20,8)	25 (29,1)	
NOS tip karcinoma	9 (14,5)	4 (16,7)	13 (15,1)	
Adenoskvamozni	2 (3,2)	0	2 (2,3)	
Ukupno	62 (100)	24 (100)	86 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Tablica 6. Ekspresija PD-L1 (1 – 49 %) po dobi i vrsti tumora

Dob	Broj (%) ispitanika po pozitivnoj ekspresiji PD-L1 i vrsti tumora					P*
	Adeno karcinom	Planocelularni karcinom	NOS tip karcinoma	Adenoskvamozni karcinom	Ukupno	
30 – 39	1 (3,2)	0	0 (0)	0	1 (1,6)	0,94
40 – 49	0 (0)	0	1/9	0	1 (1,6)	
50 – 59	6 (19,4)	4/20	1/8	0	11 (17,7)	
60 – 69	14 (45,2)	11/20	5/9	2/2	32 (51,6)	
70 – 79	8 (25,8)	4/20	2/9	0	14 (22,6)	
80 – 89	2 (6,5)	1/20	0	0	3 (4,8)	
Ukupno	31 (100)	20/20	9/9	2/2	62 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Tablica 7. Raspodjela ispitanika sa jakom ekspresijom PD-L1 (≥ 50 %) po dobi i vrsti tumora

Dob	Broj (%) pozitivnih PD-L1 ispitanika					P*
	Adeno karcinom	Skvamozni karcinom	NOS tip karcinoma	Adenoskvamozni karcinom	Ukupno	
50 – 59	3/15	1/5	2/4	0	6/24	0,34
60 – 69	6/15	2/5	0/4	0	8/24	
70 – 79	6/15	1/5	1/4	0	8/24	
80 – 89	0/15	1/5	1/4	0	2/24	
Ukupno	15/15	5/5	4/4	0	24/24	

*Fisherov egzaktni test

U skupini pušača nešto veći broj ispitanika, 13 (59,1 %) ima ekspresiju PD-L1 ≥ 50 %, ali bez značajne razlike u odnosu na ostale vrijednosti ekspresije (Tablica 8.).

Tablica 8. Raspodjela ispitanika s ekspresijom PD-L1 obzirom na naviku pušenja cigareta

	Broj (%) po ekspresiji PD-L1				P*
	< 1	1 - 49	≥ 50	Ukupno	
Pušač	34 (45,3)	28 (53,8)	13 (59,1)	75 (50,3)	0,60
Nepušač	9 (12)	8 (15,4)	2 (9,1)	19 (12,8)	
Bivši pušač	32 (42,7)	16 (30,8)	7 (31,8)	55 (36,9)	
Ukupno	75 (100)	52 (100)	22 (100)	149 (100)	

*Fisherov egzaktni test

U skupini ispitanika koji imaju pozitivnu anamnezu o pušenju (pušači ili bivši pušači) najviše ih je 66 (50,8 %) s ekspresijom PD-L1 manjom od 1, dok ekspresiju PD-L1 ≥ 50 % ima 20 (15,4 %) ispitanika, nešto više onih s NOS tipom karcinoma, ali bez značajne razlike u odnosu na ostale tipove karcinoma (Tablica 9.).

Tablica 9. Ekspresija PD-L1 po vrsti tumora u skupini onih koji imaju pozitivnu anamnezu o pušenju (pušači i bivši pušači)

	Broj (%) ispitanika					P*
	Adeno karcinom	Skvamozni karcinom	NOS tip karcinoma	Adenoskvamozni karcinom	Ukupno	
< 1	32 (48,5)	29 (59,2)	5 (35,7)	0	66 (50,8)	0,38
1 do 49	23 (34,8)	15 (30,6)	5 (35,7)	1/1	44 (33,8)	
≥ 50	11 (16,7)	5 (10,2)	4 (28,6)	0	20 (15,4)	
Ukupno	66 (100)	49 (100)	14 (100)	1/1	130 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Nema značajnih razlika u raspodjeli ispitanika s ekspresijom PD-L1 1 - 49 % i ≥ 50 % u odnosu na naviku pušenja i spol (Tablica 10.).

Tablica 10. Raspodjela ispitanika s ekspresijom PD-L1 1 - 49 % i ≥ 50 % u odnosu na naviku pušenja i spol

	Broj (%) pozitivnih PD-L1 po spolu			P*
	Muškarci	Žene	Ukupno	
PD-L1 pozitivno				
Pušač	28 (56)	13 (54,2)	41 (55,4)	0,11
Nepušač	4 (8)	6 (25)	10 (13,5)	
Bivši pušač	18 (36)	5 (20,8)	23 (31,1)	
Ukupno	50 (100)	24 (100)	74 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Nema značajnih razlika u raspodjeli ispitanika s ekspresijom PD-L1 1 - 49 % i ≥ 50 % s obzirom na tip tumora i na naviku pušenja (Tablica 11. i Tablica 12.).

Tablica 11. Raspodjela ispitanika s umjerenom i jakom ekspresijom PD-L1 1 u odnosu na naviku pušenja i tip tumora

	Broj (%) pozitivnih PD-L1 ispitanika					P*
	Adeno karcinom	Skvamozni karcinom	NOS tip karcinoma	Adenoskvamozni karcinom	Ukupno	
PD-L1 pozitivni						
Pušač	22 (53,7)	11 (50)	7 (70)	1/1	41 (55,4)	0,83
Nepušač	7 (17,1)	2 (9,1)	1 (10)	0	10 (13,5)	
Bivši pušač	12 (29,3)	9 (40,9)	2 (20)	0	23 (31,1)	
Ukupno	41 (100)	22 (100)	10 (100)	1/1	74 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Tablica 12. Raspodjela ispitanika s umjerenom i jakom ekspresijom PD-L1 u odnosu na tip tumora i na to jesu li nepušači ili su pušači/bivši pušači

Tablica 12.

	Broj (%) PD-L1 ispitanika s umjerenom i jakom ekspresijom					P*
	Adeno karcinom	Skvamozni karcinom	NOS tip karcinoma	Adenoskvamozni karcinom	Ukupno	
PD-L1 pozitivni						
Nepušač	7 (17,1)	2 (9,1)	1 (10)	0	10 (13,5)	0,83
Pušač/bivši pušač	34 (82,9)	20 (90,9)	9 (90)	1/1	64 (86,5)	
Ukupno	41 (100)	22 (100)	10 (100)	1/1	74 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Najučestaliji su tumori IVA stadija, kod 49 (57 %) ispitanika i III B kod 14 (16 %) ispitanika s umjerenom i jakom , a najmanje su zastupljeni gradusa IA2 i IB, kod 2 (1 %) ispitanika, bez značajne razlike u odnosu na spol (Tablica 13.).

Tablica 13. Raspodjela ispitanika s umjerenom i jakom ekspresijom PD-L1 prema spolu i proširenosti bolesti

	Broj (%) pozitivnih PD-L1 po spolu			P*
	Muškarci	Žene	Ukupno	
IA2	2 (3,5)	0	2 (2,3)	0,77
IB	1 (1,8)	1 (3,4)	2 (2,3)	
IIB	3 (5,3)	1 (3,4)	4 (4,7)	
IIIA	6 (11)	2 (7)	8 (9)	
IIIB	11 (19)	3 (10)	14 (16)	
IVA	29 (51)	20 (69)	49 (57)	
IVB	5 (9)	2 (7)	7 (8)	
Ukupno	57 (100)	29 (100)	86 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Postoji značajna razlika u raspodjeli ispitanika s umjerenom i jakom ekspresijom PD-L1 prema vrsti tumora i proširenosti bolesti (Fisherov egzaktni test, P = 0,001) (Tablica 14.).

Tablica 14. Proširenost bolesti ispitanika s umjerenom i jakom ekspresijom PD-L1 prema vrsti tumora

	Broj (%) pozitivnih PD-L1 ispitanika					P*
	Adenokarcinom	Planocelularni karcinom	NOS tip karcinoma	Adenoskvamozni karcinom	Ukupno	
IA2	0	2 (8)	0	0	2 (2,3)	<0,001
IB	2 (4,3)	0 (0)	0	0	2 (2,3)	
IIB	1 (2,2)	2 (8)	1 (7,7)	0	4 (4,7)	
IIIA	1 (2)	5 (20)	1 (8)	1/2	8 (9,3)	
IIIB	4 (9)	8 (32)	2 (15)	0	14 (16,3)	
IVA	35 (76)	7 (28)	7 (54)	0	49 (57)	
IVB	3 (7)	1 (4)	2 (15)	1/2	7 (8)	
Ukupno	46 (100)	25 (100)	13 (100)	2/2	86 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Najučestaliji su tumori stadija IVA, kod 67 (51,1 %) ispitanika i IIIB kod 22 (16,8 %) ispitanika, a najmanje su zastupljeni stadija IA2, kod 2 (1,5 %) ispitanika, bez značajne razlike u odnosu na prisutnost aktivacijskih mutacija i umjerenu i jaku ekspresiju PD-L1 (Tablica 15.).

Tablica 15. Stadij proširenosti tumora u odnosu na nalaz pozitivnih mutacija i umjerenu i jaku ekspresiju PD-L1

	Broj (%) ispitanika prema nalazu pozitivnih mutacija i ekspresiji					P*
	ALK	ROS	PD-L1	EGFR	Ukupno	
IA2	0	0	2 (2,3)	0	2 (1,5)	0,09
IB	0	1 (5,9)	2 (2,3)	0	3 (2,3)	
IIB	0	1 (5,9)	4 (4,7)	2 (10)	7 (5,3)	
IIIA	0	1 (5,9)	8 (9,3)	0	9 (6,9)	
IIIB	3/8	3 (17,6)	14 (16,3)	2 (10)	22 (16,8)	
IVA	4/8	7 (41,2)	49 (57)	7 (35)	67 (51,1)	
IVB	1/8	4 (24)	7 (8)	9 (45)	21 (16)	
Ukupno	8/8	17 (100)	86 (100)	20 (100)	131 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Iako nešto manji broj ispitanika s pozitivnim EGFR, ALK i ROS1 mutacijama ima umjerenu i jaku ekspresiju PD-L1, razlike u raspodjeli nisu statistički značajne (Tablica 16.).

Tablica 16. Ekspresija PD-L1-a prema statusu aktivacijskih mutacija

	Broj (%) po			P*
	Pozitivno	Negativno	Ukupno	
Ekspresija PD-L1	EGFR			
< 1	10 (62,5)	45 (45)	55 (47,4)	0,47
1 – 49	5 (31,3)	39 (39)	44 (37,9)	
≥ 50	1 (6,3)	16 (16)	17 (14,7)	
Ukupno	16 (100)	100 (100)	116 (100)	
Ekspresija PD-L1	ALK			
< 1	5 (62,5)	49 (45,8)	54 (47)	0,79
1 – 49	2 (25)	40 (37,4)	42 (36,5)	
≥ 50	1 (12,5)	18 (16,8)	19 (16,5)	
Ukupno	8 (100)	107 (100)	115 (100)	
Ekspresija PD-L1	ROS1			
< 1	11 (64,7)	44 (50)	55 (52,4)	0,47
1 – 49	4 (23,5)	35 (39,8)	39 (37,1)	
≥ 50	2 (11,8)	9 (10,2)	11 (10,5)	
Ukupno	17 (100)	88 (100)	105 (100)	

*Fisherov egzaktni test

6. RASPRAVA

U provedenom istraživanju ispitani su podaci 172 ispitanika s dijagnozom NSCLC kojima je u razdoblju od 1. siječnja 2019. godine do 31. prosinca 2020. godine učinjeno testiranje ekspresije PD-L1 u Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu. Najviše je ispitanika sa adenokarcinomom, slijede oni sa skvamoznim i NOS karcinomom, a najmanje je ispitanika sa adenoskvamoznim karcinomom.

Među ispitanicima je bilo znatno više muškaraca nego žena kojima je dijagnosticiran NSCLC. Drugi su zabilježili nešto više žena nego muškaraca (30). Podaci o dobi oboljelih od karcinom pluća i činjenica da je povezan sa starijom životnom dobi, koja navodi prosječnu dob od 70 godina, u skladu su sa medijanom dobi naših ispitanika (66 godina). Karcinom pluća se uglavnom javlja kod starijih osoba, većina ih ima 65 ili više godina a mlađih od 45 godina je vrlo mali broj (31). U približno 53 % slučajeva javlja se u odraslih od 55 do 74 godine, dok se kod starijih od 75 godina javlja u 37 % slučajeva. Samo 10 % karcinoma pluća se događa kod osoba mlađih od 55 godina, a stopa dramatično opada sa svakim desetljećem koje prethodi toj dobi (32). Žene su u dobi dijagnoze u prosjeku dvije godine mlađe od muškaraca. Iako je prosječna dob karcinoma pluća u žena tek nešto manja, mnogo je više mladih žena s rakom pluća nego mladih muškaraca (33). Karcinom pluća u osoba mlađe dobi raste, a porast je posebno visok u mladih žena nepušača. Studije tijekom posljednjih nekoliko godina sugeriraju da estrogen može pospješiti rast tumora pluća što može objasniti raniju dob dijagnoze kod žena (34). Naši ispitanici sa visokom ekspresijom PD-L1 (≥ 50 %) su nešto stariji ispitanici (od 70 i više godina), no ta razlika nije značajna u odnosu na mlađe ispitanike.

Pozitivna ekspresija PD-L1 više je uočena kod muškaraca nego kod žena. Visoku su ekspresiju nešto više imale žene, ali razlika u ekspresiji PD-L1 u odnosu na spol nije uočena. U literaturi se mogu pronaći podaci metaanaliza o češćoj povezanosti pozitivne ekspresije PD-L1 i ženskog spola (35). Drugi pak ističu značajnu povezanost pozitivne ekspresije PD-L1 u adenokarcinomima s muškim spolom ali ne i s muškaracima sa skvamoznim karcinomom (36).

Umjerena i visoka ekspresija (1- 49 % i ≥ 50 %) PD-L1 nađena je kod 86 (50 %) ispitanika, visoku ekspresiju (≥ 50 %) imala su 24 (14 %) ispitanika, a umjerenu njih 62 (36 %). Slične su vrijednosti imali i drugi (25). Višu su pojavnost ekspresije pri pragovima većim od 50 %, odnosno između 1 % i 49 % prikazali Gagne i sur. uz objašnjenje da su u istraživanju raspolagali većim brojem staničnih blokova nastalih iz endobronhalnih punktata metastaza limfnih čvorova a posljedično i većim brojem tumorskih stanica za analizu. Isti su autori češće

našli pozitivnu ekspresiju PD-L1 kod skvamoznog karcinoma u usporedbi sa adenokarcinomom (37).

Ispitivana je i povezanost ekspresije PD-L1 i tipa NSCLC, najviše je bilo adenokarcinoma (52 %), potom skvamoznih karcinoma (35 %), a značajna razlika u ekspresiji prema tipu tumora, u raspodjeli ispitanika prema dobi i vrsti tumora, posebno u skupni ispitanika s ekspresijom PD-L1 od 1 – 49 % i u skupini ispitanika s ekspresijom PD-L1 ≥ 50 %, nije nađena. Zheng je sa suradnicima češće našao pozitivnu ekspresiju PD-L1 kod skvamoznog karcinoma u usporedbi sa adenokarcinomom (25), kao i drugi čija je studija pokazala da je PD-L1 potencijalni biomarker za terapiju inhibitorima PD-1 / PD-L1 kod bolesnika sa skvamoznim karcinomom pluća povezanih s pušenjem - ekspresija PD-L1 otkrivena u 61,7 % bolesnika (38). Drugi zaključili da korelacija ekspresije PD-L1 i odgovora na inhibitore kontrolne točke može biti važnija za bolesnike sa adenokarcinomom (39).

Analizirajući u preglednom članku izazove i greške u IH detekciji PD-L1 u populaciji bolesnika NSCLC, Yu i sur. (23) usporedili su prevalenciju ekspresije PD-L1 u 28 istraživanja te ustanovili su da se ona kreće se od 24 % do 60 %, čak i kad je granična vrijednost pozitivnosti postavljena na 5 %. Zaključili su da je loša strana viših pragova pozitivnosti to što se veći broj pacijenata koji mogu imati koristi od imunoterapije može označiti kao negativan. Heterogenost obojenja PD-L1 u uzorku može biti razlogom da se uzorak s manjim postotkom obojenja označi negativnim, iako može imati veći postotak ekspresija drugoj regiji. Bojenje dijelova iz različitih blokova tumora bi moglo pomoći u izbjegavanju lažno negativnih rezultata zbog heterogenosti, to najčešće nije praktično rješenje ovog problema, jer je obično dostupan samo jedan tumorski blok. U slučajevima gdje je granična vrijednost pozitivnosti postavljena prenisko, može se dogoditi da se imunoterapijom liječe bolesnici u kojih je vjerojatnost povoljnog odgovora jako mala, uz pojavu nepotrebnih neželjenih učinaka imunoterapije, a pri tom propustiti priliku za povoljniju vrstu terapije.

Za 149 ispitanika nam je bio dostupan podatak o statusu pušenja cigareta i to za 105 (70,5 %) muškaraca i 44 (29,5 %) žene. Nepušača je u istraživanju bilo 19 (12,8 %), 10 žena i 9 muškaraca. Nismo našli značajnih razlika u raspodjeli ispitanika s pozitivnom i visokom ekspresijom (PD-L1 1-49 % i ≥ 50 %) u odnosu na naviku pušenja i spol te s obzirom na tip tumora i naviku pušenja. U skupini ispitanika sa visokom ekspresijom PD-L1 bilo je nešto više ispitanika sa NOS NSCLC ali ta razlika nije bila značajna. Ispitujući povezanost ekspresije PD-L1 i tipa tumora na velikoj kohorti ispitanika u zapadnoj Kini autori su zaključili da u bolesnika

sa adenokarcinomom postoji značajna povezanost sa muškim spolom koji su ujedno trenutni ili bivši pušači, uz ogradu da je u istraživanju bio samo mali broj žena pušača (36). A ima zapažanja da je ekspresija PD-L1 povećana u muškaraca sa skvamoznim karcinomom pluća (40).

Povezanost pušačkog statusa i terapije inhibitorima kontrolnih točaka analizirana je u nekoliko metaanaliza. Jedni su ukazali na to da kod bolesnika pušača sa NSCLC za razliku nepušača, postoji tendencija dobrog odgovora na inhibitore kontrolnih točaka, a drugi su suprotno tome zaključili da nema razlike u odgovoru na terapiju kod sadašnjih i bivših pušača u odnosu na nepušače (41). Posljednjih je 20 godina povećan fokus na spolne razlike u zdravlju i bolestima. Najranija istraživanja karcinoma pluća obuhvaćala su uglavnom muškarce, jer je učestalost karcinoma pluća među ženama bila izuzetno niska. Kako su se društveni obrasci mijenjali oko Drugog svjetskog rata, kad su žene počele sve više pušiti, promijenila se i epidemiologija karcinoma pluća. Veći udio karcinoma pluća u žena koje ne puše u usporedbi s muškarcima koji ne puše, sugerira da se bolest ponaša drugačije u žena. Studije karcinoma pluća na ženama ukazuju na to da postoje razlike u čimbenicima rizika, histologiji, patofiziologiji, ishodima liječenja i prognozama u usporedbi s muškarcima. Za razliku od muškaraca, veći je postotak žena koje obole od karcinoma pluća a da nikada nisu pušile, kod muškaraca samo 1 od 12 muškaraca s karcinomom pluća nikada nije pušio (42).

Ustanovili smo da iako nešto manji broj ispitanika s pozitivnim EGFR, ALK i ROS1 mutacijama ima ekspresiju PD-L1-a od 1 – 49 % i ≥ 50 %, razlike u raspodjeli nisu bile statistički značajne. Značajnu povezanost visoke ekspresije PD-L1 i negativnih EGFR i ALK mutacija potvrdili su jedni (40) (25, 43) drugi su pak naveli postojanje povezanosti visoke ekspresije PD-L1 sa EGFR mutacijom, ali ne i sa pozitivnom ALK mutacijom (40) te povezanost ekspresije PD-L1 sa ROS1 mutacijom ali ne i sa EGFR mutacijom (tj statistički je povezana sa negativnim nalazom EGFR mutacije (44). Jedna je studija ustanovila da su bolesnici sa NSCLC pozitivni na aktivacijske mutacije (EGFR i ALK) pokazali nisku stopu odgovora na imunoterapiju blokatorima imunosnih kontrolnih točaka (PD-1/ PD-L1) (45).

Zhang i suradnici su proveli sveobuhvatnu meta-analizu 47 istraživanja kako bi istražili značaj ekspresije PD-L1 kao prognostičkog biljega i utvrdili vezu ekspresije PD-L1 s kliničko-patološkim značajkama i aktivacijskim mutacijama u bolesnika s karcinomom pluća i ustanovili da visoka ekspresija PD-L1 nije povezana s ALK preslagivanjima. U nekih je pozitivnost na PD-L1 bila češća uz negativan EGFR a u drugih povezanost između ekspresije PD-L1 i

mutacija EGFR nije nađena. Objašnjenje kontradiktornih nalaza među studijama je da su posljedica heterogenosti analiziranih ispitanika te u primjeni različitih pragova pozitivnosti PD-L1. Zaključili su i da je visoka ekspresija PD-L1 bila je pokazatelj loše prognoze u azijskoj populaciji, ali ne i u pripadnika ostalih rasa, što sugerira da povezanost između ekspresije PD-L1 i prognoze ovisi o etničkoj pripadnosti (40). Istražujući povezanost spola, etničke pripadnosti, pušačkog statusa, proširenosti bolesti, mjesta biopsije (primarni tumor/metastaza) ili vrstom uzorka biopsije ustanovljeno je da se ekspresija PDL-1 ≥ 50 % rijetko preklapa s prisutnošću pogonskih mutacija (46).

Bolesnici koji se danas liječe od karcinoma pluća, dijagnosticirani su najčešće s uznapredovalom bolešću, kada je veličina tumora veća od dva centimetra (pa sve do deset centimetara) i najčešće s metastazama (2, 44). U našem su istraživanju bolesnici dijagnosticirani najčešće u stadiju IVA, njih 49 (57 %) i stadiju IIIB njih 14 (16 %), a najmanje su bili zastupljeni stadiji IA2 i IB, kod 2 (1 %) ispitanika, bez značajne razlike u odnosu na spol. Ustanovili smo da postoji značajna razlika u raspodjeli ispitanika s ekspresijom PD-L1 1-49 % i ≥ 50 % prema vrsti tumora i proširenosti bolesti. Bolesnici sa adenokarcinomom su u odnosu na one sa skvamoznim karcinomom u stadiju IVA značajno češće imali umjerenu i jaku PD-L1 pozitivnost, što su ustanovili i drugi (30). Razlika u ekspresiji PD-L1 u odnosu na nalaz aktivacijskih mutacija u našem istraživanju nije bila značajna. Skov i sur. (30) su u svom istraživanju ispitujući povezanost ekspresije PD-L1 i nekih kliničko-patoloških značajki (spol, pušački status, tip i mjesto uzorka te stadij bolesti) kod 800 ispitanika, ustanovili da je stadij bolesti najvažniji prediktor ekspresije PD-L1. Dob, spol i status pušenja nisu imali statistički značajan utjecaj niti za jednu graničnu vrijednost ekspresije PD-L1. U istoj su studiji uočili značajnu razliku u ekspresiji PD-L1 u korist adenokarcinoma u odnosu na karcinom skvamoznih stanica. U drugim su istraživanjima višu ekspresiju pokazali skvamozni karcinomi (47, 48), a neki su čak ustanovili da razlike u ekspresiji između adenokarcinoma i karcinoma skvamoznih stanica nema (49). Unatoč oprečnim podacima o prognostičkoj vrijednosti ekspresije PD-L1, rezultati koji se odnose na veću ekspresiju PD-L1 u bolesnika u višem stadiju NSCLC su uvjerljiviji. Vjerojatno je da se prognostički značaj odnosi na ukupnu ravnotežu imunološkog odgovora domaćina i imunosupresije posredovane tumorom. Ekspresija PD-L1 je možda samo jedan od čimbenika u ovoj ravnoteži (50).

Imunoterapija je dramatično je promijenila način liječenja bolesnika sa uznapredovalim NSCLC. Određivanje ekspresije PD-L1 pomoću IH je standard u kliničkoj obradi i dalje je jedini klinički odobreni biomarker za predviđanje odgovora na imunoterapiju (51). Međutim,

razina ekspresije PD-L1 nije bez ograničenja; ne reagiraju svi bolesnici s visokom ekspresijom na imunoterapiju, a neki pacijenti s niskom ili nikakvom ekspresijom još uvijek reagiraju. Takve su nedosljednosti potaknule istraživanje drugih markera (52).

7. ZAKLJUČAK

1. Nije uočena razlika u umjerenoj i jakoj ekspresiji PD-L1 prema tipu nesitnostaničnog karcinoma pluća.
2. Iako je jaka ekspresija PD-L1 nađena u nešto više žena, razlika u odnosu na spol nije uočena.
3. Također nije uočena razlika ekspresije PD-L1 u odnosu na dob i naviku pušenja te na spol i naviku pušenja.
4. Umjerena i jaka ekspresija PD-L1 razlikovala se s obzirom na vrstu tumora i proširenost bolesti, a najučestaliji su adenokarcinomi u IVA stadiju.
5. Iako nešto manji broj ispitanika s pozitivnim EGFR, ALK i ROS1 mutacijama ima umjerenu i jaku ekspresija PD-L1-a, razlike u raspodjeli nisu uočene.

8. SAŽETAK

CILJ: Cilj istraživanja je ispitati učestalost ekspresije PD-L1 u bolesnika s NSCLC te analizirati povezanost ekspresije PD-L1 s kliničko-patološkim karakteristikama bolesnika.

USTROJ STUDIJE: Istraživanje je postavljeno kao presječno istraživanje.

METODE: Istraživanjem su obuhvaćena 172 ispitanika (120 muškaraca i 52 žene) s NSCLC kod kojih je provedeno testiranje ekspresije PD-L1 na bioptičkom materijalu i staničnim blokovima, koja je određivana imunohistokemijskom metodom.

REZULTATI: Median dobi ispitanika je 66 godina. Značajna razlika u umjerenoj i jakoj ekspresiji PD-L1 prema tipu tumora nije uočena. Iako jaku ekspresiju PD-L1 imaju nešto više žene, razlika u odnosu na spol nije uočena. Nešto su stariji ispitanici (od 70 i više godina) sa jakom ekspresijom PD-L1, no ta razlika nije uočena u odnosu na mlađe ispitanike. Također nije uočena razlika ekspresije PD-L1 u odnosu na dob i naviku pušenja te na spol i naviku pušenja. Umjerena i jaka ekspresija PD-L1 razlikovala se s obzirom na vrstu tumora i proširenost bolesti, a najučestaliji su adenokarcinomi u IVA stadiju. Iako nešto manji broj ispitanika s pozitivnim EGFR, ALK i ROS1 mutacijama ima umjerenu i jaku ekspresija PD-L1-a, razlike u raspodjeli nisu uočene.

ZAKLJUČAK: Razlike u umjerenoj i jakoj ekspresiji PD-L1 prema tipu tumora, dobi, navici pušenja i spolu nisu uočene. Iako nešto manji broj ispitanika s pozitivnim EGFR, ALK i ROS1 mutacijama ima umjerenu i jaku ekspresija PD-L1-a, razlike u raspodjeli nisu uočene.Uočena je razlika u umjerenoj i jakoj ekspresije PD-L1 prema vrsti tumora i proširenosti bolesti, najučestaliji su adenokarcinomi u IVA stadiju.

KLJUČNE RIJEČI: imunohistokemija, karcinom pluća, nesitnostanični karcinom pluća, PD-L1

9. ABSTRACT

Programmed cell death ligand 1 expression in patienst with non–small cell lung carcinoma: association with clinical and pathological features and molecular alterations

OBJECTIVE: The aim of the study was to examine the frequency of PD-L1 expression in patients with NSCLC and to analyze the association of PD-L1 expression with clinical and pathological characteristics of patients.

STUDY STRUCTURE: The survey was set up as a cross-sectional survey.

METHODS: The study included 172 subjects (120 men and 52 women) with NSCLC in whom PD-L1 expression testing was performed on biopsy material and cell blocks, which was determined by immunohistochemical method.

RESULTS: The median age of the respondents was 66 years. No significant difference in moderate and strong expression of PD-L1 by tumor type was observed. Although slightly more women have strong PD-L1 expression, no gender difference was observed. Slightly older subjects (aged 70 and over) had a strong PD-L1 expression, but this difference was not observed among younger subjects. There was also no difference in PD-L1 expression in relation to age and smoking habit and in gender and smoking habit. Moderate and strong PD-L1 expression varied according to tumor type and disease extent, with stage IV adenocarcinomas being the most common. Although a slightly smaller number of subjects with positive EGFR, ALK, and ROS1 mutations had moderate and strong expression of PD-L1, no differences in distribution were observed.

CONCLUSION: No significant difference was found in moderate and strong expression of PD-L1 expression by tumor type, age, smoking habit, and gender were observed. Although a slightly smaller number of subjects with positive EGFR, ALK and ROS1 mutations have moderate and strong expression of PD-L1, no differences in the distribution were observed. stage IVA adenocarcinomas.

KEY WORDS: immunohistochemistry, lung cancer, non-small cell lung cancer, PD-L1

10. LITERATURA

1. Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu [Internet]. [cited 2021 May 6]. Available from: https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/
2. Nacionalni program za probir i rano otkrivanje raka pluća 2020. – 2024. Ministarstvo zdravstva Zagreb, siječanj 2020.
3. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. The Lancet. 2018 Mar 17;391(10125):1023–75.
4. Šekerija M, Bubanović L, Novak P, Čukelj P, Lončar J, Štruc K, et al. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2018., Bilten 43, Zagreb, 2020. (41):37.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394–424.
6. Doll R, Hill AB. Smoking and Carcinoma of the Lung. Br Med J. 1950 Sep 30;2(4682):739–48.
7. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra MG, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2016 Sep;27(suppl 5):v1–27.
8. Samaržija M, Jakopović M, Boban, Bošković L, Belac Lovasić I, Juretić A, et al. Smjernice za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka pluća nemalih stanica. Liječnički Vjesn. 2017;139(11–12):365–71.
9. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. 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 Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer. 2016 Jan;11(1):39–51.
10. Osmani L, Askin F, Gabrielson E, Li QK. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. Semin Cancer Biol. 2018 Oct;52(Pt 1):103–9.
11. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. Surg Oncol Clin N Am. 2016 Jul;25(3):447–68.

12. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. J Thorac Oncol. 2015 Sep 1;10(9):1243–60.
13. Drpa G KS. Otkrivanje i liječenje uznapredovalog raka pluća nemalih stanica s ALK i ROS1 mutacijom. Medix. 1917;127/128:127–9.
14. Shergold AL, Millar R, Nibbs RJB. Understanding and overcoming the resistance of cancer to PD-1/PD-L1 blockade. Pharmacol Res. 2019 Jul;145:104258.
15. Saab S, Zalzale H, Rahal Z, Khalifeh Y, Sinjab A, Kadara H. Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment. Front Immunol. 2020;11:159.
16. Callea M, Pedica F, Doglioni C. Programmed death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) as a new frontier in cancer Immunotherapy and challenges for the Pathologist: state of the art. Pathologica. 2016 Jun;108(2):48–58.
17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
18. Lin Z, Xu Y, Zhang Y, He Q, Zhang J, He J, et al. The prevalence and clinicopathological features of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression: a pooled analysis of literatures. Oncotarget. 2016 Mar 22;7(12):15033–46.
19. Mino-Kenudson M. Immunohistochemistry for predictive biomarkers in non-small cell lung cancer. Transl Lung Cancer Res. 2017 Oct;6(5):570–87.
20. Inamura K. Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer. Cancers. 2018 Mar 14;10(3).
21. Radulović P, Krušlin B. Immunohistochemical expression of pd-l1 in solid tumors. Libri Oncol Croat J Oncol. 2017 Dec 21;45(2–3):43–5.
22. Jakopović M. Immunotherapy in the treatment of non-small lung cancer. Libri Oncol. 2017;(45 (2-3)):60–4.
23. Yu H, Boyle TA, Zhou C, Rimm DL, Hirsch FR. PD-L1 Expression in Lung Cancer. J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer. 2016 Jul;11(7):964–75.
24. Chae YK, Pan A, Davis AA, Raparia K, Mohindra NA, Matsangou M, et al. Biomarkers for PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer: Is PD-L1 Expression a Good Marker for Patient Selection? Clin Lung Cancer. 2016 Sep;17(5):350–61.
25. Zheng Q, Huang Y, Zeng X, Chen X, Shao S, Jin Y, et al. Clinicopathological and molecular characteristics associated with PD-L1 expression in non-small cell lung cancer:

a large-scale, multi-center, real-world study in China. J Cancer Res Clin Oncol. 2021 May;147(5):1547–56.

26. Hofman P. PD-L1 immunohistochemistry for non-small cell lung carcinoma: which strategy should be adopted? Expert Rev Mol Diagn. 2017 Dec;17(12):1097–108.
27. Marušić M i sur. Uvod u znanstveni rad u medicini. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
28. Smojver-Ježek S, Vrabec Branica B. Dogovor o terminologiji i načinu pisanja citoloških nalaza karcinoma pluća. Tečaj trajne medicinske izobrazbe. Hrvatsko torakalno društvo. Zagreb. 27.2.2015 [Internet]. Available from: citologija.hlz.hr/wp-content/.../03/Pisanje-citoloskih-nalaza.ppsx.
29. Ivanković d i sur. Osnove statističke analize za medicinare. Zagreb: Medicinski fakultet;
30. Skov BG, Rørvig SB, Jensen THL, Skov T. The prevalence of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer in an unselected, consecutive population. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. 2020 Jan;33(1):109–17.
31. Lung Cancer Statistics | How Common is Lung Cancer? [Internet]. [cited 2021 May 23]. Available from: https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/key-statistics.html
32. de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. Transl Lung Cancer Res. 2018 Jun;7(3):220–33.
33. John U, Hanke M. Age- and Sex-Specific Trends in Lung Cancer Mortality over 62 Years in a Nation with a Low Effort in Cancer Prevention. Int J Environ Res Public Health. 2016 Mar 25;13(4):362.
34. Chakraborty S, Ganti AK, Marr A, Batra SK. Lung cancer in women: role of estrogens. Expert Rev Respir Med. 2010 Aug;4(4):509–18.
35. Yang H, Chen H, Luo S, Li L, Zhou S, Shen R, et al. The correlation between programmed death-ligand 1 expression and driver gene mutations in NSCLC. Oncotarget. 2017 Feb 22;8(14):23517–28.
36. Chen Q, Fu Y-Y, Yue Q-N, Wu Q, Tang Y, Wang W-Y, et al. Distribution of PD-L1 expression and its relationship with clinicopathological variables: an audit from 1071 cases of surgically resected non-small cell lung cancer. Int J Clin Exp Pathol. 2019 Mar 1;12(3):774–86.
37. Gagné A, Wang E, Bastien N, Orain M, Desmeules P, Pagé S, et al. Impact of Specimen Characteristics on PD-L1 Testing in Non-Small Cell Lung Cancer: Validation of the IASLC PD-L1 Testing Recommendations. J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer. 2019 Dec;14(12):2062–70.

38. Shukuya T, Carbone DP. Predictive Markers for the Efficacy of Anti-PD-1/PD-L1 Antibodies in Lung Cancer. J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer. 2016 Jul;11(7):976–88.
39. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2015 Oct 22;373(17):1627–39.
40. Zhang M, Li G, Wang Y, Wang Y, Zhao S, Haihong P, et al. PD-L1 expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: a meta-analysis. Sci Rep. 2017 Aug 31;7(1):10255.
41. Mo J, Hu X, Gu L, Chen B, Khadaroo PA, Shen Z, et al. Smokers or non-smokers: who benefits more from immune checkpoint inhibitors in treatment of malignancies? An up-to-date meta-analysis. World J Surg Oncol. 2020 Jan 20;18(1):15.
42. North CM, Christiani DC. Women and Lung Cancer: What's New? Semin Thorac Cardiovasc Surg [Internet]. 2013 [cited 2021 May 23];25(2). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3827695/
43. Li C, Liu J, Xie Z, Zhu F, Cheng B, Liang H, et al. PD-L1 expression with respect to driver mutations in non-small cell lung cancer in an Asian population: a large study of 1370 cases in China. Ther Adv Med Oncol. 2020 Jan 1;12:1758835920965840.
44. Lee J, Park CK, Yoon H-K, Sa YJ, Woo IS, Kim HR, et al. PD-L1 expression in ROS1-rearranged non-small cell lung cancer: A study using simultaneous genotypic screening of EGFR, ALK, and ROS1. Thorac Cancer. 2019 Jan;10(1):103–10.
45. Gainor JF, Shaw AT, Sequist LV, Fu X, Azzoli CG, Piotrowska Z, et al. EGFR Mutations and ALK Rearrangements Are Associated with Low Response Rates to PD-1 Pathway Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2016 Sep 15;22(18):4585–93.
46. Rangachari D, VanderLaan PA, Shea M, Le X, Huberman MS, Kobayashi SS, et al. Correlation between Classic Driver Oncogene Mutations in EGFR, ALK, or ROS1 and 22C3-PD-L1 ≥50% Expression in Lung Adenocarcinoma. J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer. 2017 May;12(5):878–83.
47. Ye L, Leslie C, Jacques A, Mesbah Ardakani N, Amanuel B, Millward M. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer in a Western Australian population and correlation with clinicopathologic features. Mod Pathol. 2019 Apr;32(4):524–31.

48. Sun J-M, Zhou W, Choi Y-L, Choi S-J, Kim SE, Wang Z, et al. Prognostic Significance of PD-L1 in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A Large Cohort Study of Surgically Resected Cases. J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer. 2016 Jul;11(7):1003–11.
49. Evans M, O'Sullivan B, Smith M, Taniere P. Predictive markers for anti-PD-1/PD-L1 therapy in non-small cell lung cancer—where are we? Transl Lung Cancer Res [Internet]. 2018 Dec [cited 2021 Jun 2];7(6). Available from: https://tlcr.amegroups.com/article/view/22942
50. Vrankar M, Kern I, Stanic K. Prognostic value of PD-L1 expression in patients with unresectable stage III non-small cell lung cancer treated with chemoradiotherapy. Radiat Oncol. 2020 Oct 29;15(1):247.
51. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. J Thorac Oncol. 2017 Feb 1;12(2):208–22.
52. Bodor JN, Boumber Y, Borghaei H. Biomarkers for immune checkpoint inhibition in non–small cell lung cancer (NSCLC). Cancer. 2020;126(2):260–70.

11. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI

- Ime i prezime: Ana Lončar
- Datum i mjesto rođenja: 19.studeni 1995. Osijek
- Adresa stanovanja: Mrežnička 16, 31 000 Osijek
- Kontakt: Mob +385958626814
- E-mail: ana.lon99@gmail.com

OBRAZOVANJE

- Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku 2010. – 2014.
- Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu 2014. – 2015.
- Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku 2015. – 2021.

OSOBNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

- Engleski jezik – aktivno
- Njemački jezik (Goethe institut – A2)

SUDJELOVANJE NA KONGRESIMA

AKTIVNO

- 13. – 14. veljače 2019. godine sudjelovala na 2nd International Translational Medicine Congress of Students and Young Physicians – ″EGFR, ALK, ROS1 and PD-L1 molecular testing in patients with non-small cell lung cancer″
- 13. – 14. veljače 2019. godine sudjelovala na 2nd International Translational Medicine Congress of Students and Young Physicians – ″Immunocytochemical identification of carcinomas of unknown primary in serous effusions″

PASIVNO

- 13. – 14. veljače 2019. godine sudjelovala na 2nd International Translational Medicine Congress of Students and Young Physicians - ″Cytodiagnostics of pancreatic neuroendocrine tumor: a case report″ poster prezentacija
- 13. – 15. svibnja 2021. godine sudjelovala na 6. hrvatskom kongresu kliničke citologije s međunarodnim sudjelovanjem - ″Epitheloid malignant mesothelioma presented with subcutaneous metastasis: a case report″ poster prezentacija

OSTALE AKTIVNOSTI

2018. godine volontirala u volonterskoj akciji udruge Alerga „Alerga u službi zdravlja“
2019. godine volontirala u volonterskoj akciji udruge Alerga „Dišimo zajedno s Alergom do zdravlja“
2019. godine pohađala radionicu Osnove znanstvenog istraživanja, Medicinski fakultet u Osijeku