

# Imunoterapija u liječenju tumora glave i vrata

---

**Belović, Morana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:295095>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

**Morana Belović**

**Imunoterapija u liječenju tumora glave i vrata**

**Diplomski rad**



Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu KBC Sestre milosrdnice pod vodstvom dr.sc. Marina Prpića, dr.med., i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023.

SAŽETAK .....	i
SUMMARY .....	ii
1. UVOD .....	1
2. TUMORSKA IMUNOLOGIJA – OSNOVA ZA IMUNOTERAPIJU .....	3
2.1. Imunosni odgovor na tumore .....	3
2.2. Tumorsko izbjegavanje imunosnog odgovora .....	5
2.2.1. Otpornost na staničnu smrt .....	5
2.2.2. Tumorski mikrookoliš (TME).....	6
2.2.2.1. Poticanje rasta i razvoja tumora; imunosupresivno djelovanje .....	6
2.2.2.2. Oslabljena protutumorska aktivnost.....	8
3. IMUNOTERAPIJA.....	10
4. IMUNOSNE CHECKPOINT MOLEKULE .....	13
4.1. CTLA-4.....	13
4.2. PD-1 .....	14
5. TUMORSKI MIKROOKOLIŠ I IZBJEGAVANJE IMUNOSNOG ODGOVORA U TUMORIMA GLAVE I VRATA.....	17
6. DIJAGNOSTICIRANJE TUMORA GLAVE I VRATA .....	22
7. INHIBITORI IMUNOSNIH KONTROLNIH TOČAKA U TERAPIJI TUMORA GLAVE I VRATA .....	25
7.1. PD-1/PD-L1 signalni put – osnova za terapiju tumora glave i vrata .....	25
7.2. Pembrolizumab .....	27
7.3. Nivolumab.....	28
8. NUSPOJAVE TERAPIJE PD-1 INHIBITORIMA .....	30
8.1. Endokrinološke nuspojave .....	34
8.2. Gastrointestinalne nuspojave .....	34
8.3. Dermatološke nuspojave .....	35
8.4. Reumatološka toksičnost.....	35
8.5. Neurološke nuspojave .....	36
8.6. Kardiovaskularna toksičnost .....	36
8.7. Pulmološke nuspojave .....	37
9. REZISTENCIJA NA IMUNOTERAPIJU PD-1 INHIBITORIMA .....	38
9.1. Tumorski neoantigeni .....	38

9.2. Tumorsko mutacijsko opterećenje (eng. <i>tumor mutational burden</i> , TMB) .....	39
9.3. Tumorski mikrookoliš.....	39
9.4. Karakteristike pacijenata.....	40
9.5. Predviđanje odgovora na terapiju PD-1 inhibitorima .....	41
10. IMUNOTERAPIJA TUMORA GLAVE I VRATA U HRVATSKOJ.....	43
10.1. Pembrolizumab .....	43
10.2. Nivolumab.....	43
11. KOMBINIRANO LIJEČENJE IMUNOTERAPIJOM I DRUGIM TERAPIJSKIM MODALITETIMA .....	44
11.1. Kombinacija s kirurškim liječenjem .....	44
11.2. Kombinacija s kemoterapijom .....	45
11.3. Kombinacija s radioterapijom.....	46
ZAHVALE.....	49
LITERATURA .....	50
ŽIVOTOPIS.....	61

## SAŽETAK

„Imunoterapija u liječenju tumora glave i vrata“

Morana Belović

Tumori glave i vrata skupina su maligniteta porijeklom iz mnogoslojnog pločastog epitela koja zahvaća gornji aerodigestivni trakt. Nalaze se u prvih deset najčešćih karcinoma, a njihova incidencija je u porastu uslijed raširenosti i učestalosti rizičnih faktora koji promiču njihov nastanak. Tradicionalno, primarni modalitet liječenja ove skupine tumora bila je kirurška operacija uz adjuvantnu radioterapiju, odnosno primarna radioterapija, međutim obje su metode dovodile do visokog stupnja mutilacije i smanjenja kvalitete života pacijenata, pogotovo u slučaju lokalno proširenih i metastatskih tumora. Napretkom imunologije kao znanosti, otkriveno je da su tumori općenito, a posebice tumori glave i vrata, imunološki vrlo aktivna tkiva, s burnim odgovorom imunskog sustava na prisutnost tumorskih stanica. Na osnovu toga, razvijen je novi terapijski modalitet s ciljem djelovanja na imunostane stanice u tumorskom mikrookolišu – imunoterapija. Tip imunoterapije u kliničkoj upotrebi u liječenju tumora glave i vrata su inhibitori imunskih kontrolnih točaka, konkretno inhibitori PD-1 (eng. *Programmed Death 1*) signalnog puta. Ovaj rad prikazuje pregled tumorske imunosti kao osnove za imunoterapiju, te specifičnosti izuzetno imunostano aktivnog tumorskog mikrookoliša u tumorima glave i vrata, na osnovu koje je i započela klinička primjena imunoterapije u liječenju ovih malignih bolesti. Razrađena je problematika same imunoterapije kao novog i još često eksperimentalnog terapijskog modaliteta; spomenuti su svi njezini oblici, s posebnim naglaskom na terapiju PD-1 inhibitorima, koja se primjenjuje u tumorima glave i vrata. Navedeni su i neželjeni događaji vezani uz primjenu PD-1 inhibitora, primatno štetni učinci odnosno nuspojave te razvoj rezistencije. Od štetnih su učinaka najznačajniji oni specifični za imunoterapiju; iako relativno rijetki, mogu uzrokovati ozbiljne i dugotrajne zdravstvene probleme. Razvoj rezistencije predstavlja jedan od najvećih problema pri liječenju imunostano aktivnim spojevima; mogući uzroci ove pojave su brojni, a kriju se kako u prirodi tumorskog tkiva, tako i u fiziologiji samih pacijenata. Kako bi se doskočilo spomenutim nedostacima primjene imunoterapije, ekstenzivno se istražuju kombinacije s drugim terapijskim modalitetima uobičajenima za liječenje malignih bolesti; neke se od njih već primjenjuju, dok su druge tek u ranim fazama ispitivanja.

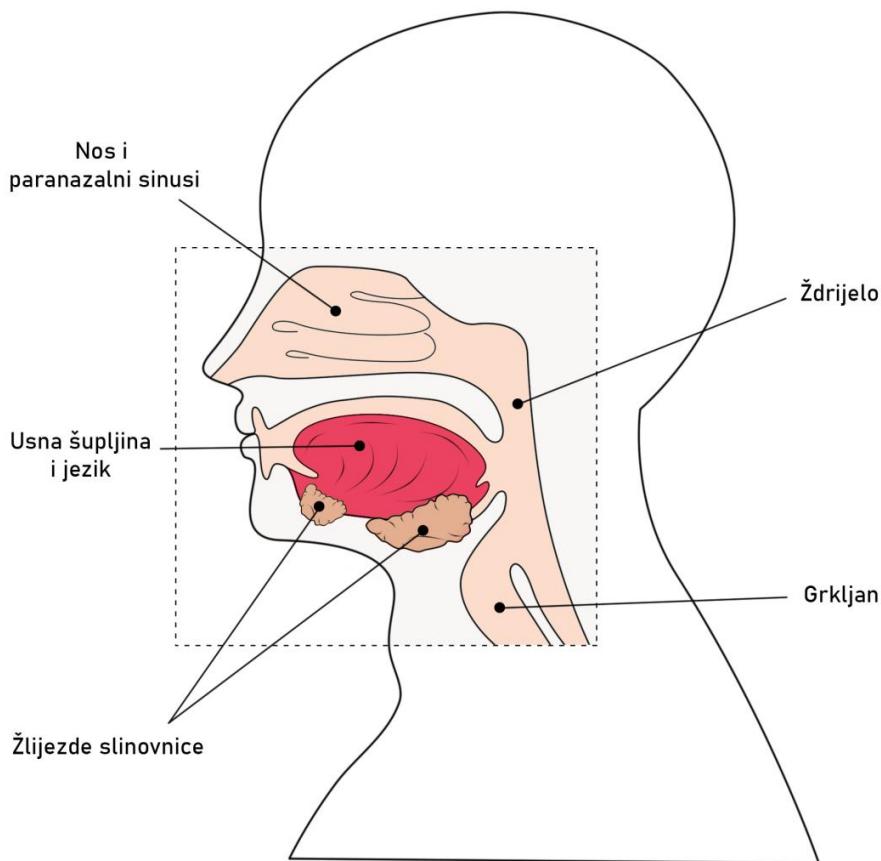
## SUMMARY

„Immunotherapy in the treatment of head and neck tumors“  
Morana Belović

Head and neck tumors are a group of malignancies originating from the stratified squamous epithelium and affecting the upper aerodigestive tract. They are in the top ten most common cancers, and their incidence is increasing due to the prevalence and frequency of risk factors that promote their occurrence. Traditionally, the primary treatment modality for this group of tumors was surgery with adjuvant radiotherapy, i.e. primary radiotherapy; however, both methods led to a high degree of mutilation and reduced quality of life for patients, especially in the case of locally advanced and metastatic tumors. With the progress of immunology, it was discovered that tumors in general, and head and neck tumors in particular, are very immunologically active tissues, with an extensive response of the immune system to the presence of tumor cells. Based on this, a new therapeutic modality was developed with the aim of acting on immune cells in the tumor microenvironment - immunotherapy. The type of immunotherapy in clinical use in the treatment of head and neck tumors are immune checkpoint inhibitors, specifically inhibitors of the PD-1 (programmed death 1) signaling pathway. This paper presents an overview of tumor immunity as a basis for immunotherapy, and the specificities of the extremely immunologically active tumor microenvironment in head and neck tumors, on the basis of which the clinical application of immunotherapy in the treatment of these malignant diseases began. The issue of immunotherapy itself as a new and often still experimental therapeutic modality is elaborated; all its forms are mentioned, with special emphasis on PD-1 inhibitor therapy, which is used in head and neck tumors. Adverse events related to the use of PD-1 inhibitors, primarily adverse effects or side effects, as well as the development of resistance are also listed. Of the adverse effects, the most significant are those specific to immunotherapy; although relatively rare, they can cause serious and long-term health problems. The development of resistance represents one of the biggest problems of treatment with immunologically active compounds; the possible causes of this phenomenon are numerous, and can be found both in the nature of the tumor tissue and in the physiology of the patients themselves. In order to overcome the mentioned shortcomings of the use of immunotherapy, combinations with other therapeutic modalities common for the treatment of malignant diseases are extensively researched; some of them are already being implemented, while others are only in the early stages of testing.

## 1. UVOD

Tumori glave i vrata raznolika su skupina maligniteta, koji nastaju u anatomskim strukturama smještenima između baze lubanje i gornje torakalne aperture(1). Prema klasifikaciji American Joint Committee on Cancer (AJCC) i desetoj reviziji Međunarodne klasifikacije bolesti (MKB-10) Svjetske zdravstvene organizacije, ovoj skupini prvenstveno pripadaju karcinomi pločastih stanica porijeklom iz epitela sluznice gornjeg aerodigestivnog trakta (usne šupljine, ždrijela, grkljana, nosne šupljine i paranazalnih sinusa) te velikih i malih žlijezda slinovnica (1–3), zajedničkog naziva karcinomi glave i vrata. Meko tkivni tumori su na navedenim lokacijama mnogo rjeđi od spomenutih skvamoznih karcinoma, dok se tumori očiju, mozga, štitne žlijezde, vratnog dijela jednjaka te kože glave i vrata ne svrstavaju u skupinu tumora glave i vrata(4). Skupni prikaz područja zahvaćenih karcinomima glave i vrata vidljiv je na Slici 1.



**Slika 1. Područja zahvaćena karcinomima glave i vrata**



Karcinomi glave i vrata nalaze se u prvih deset najčešćih karcinoma prema broju novih slučajeva godišnje (3,5); 2020. godine zauzimali su 6. mjesto s preko 930 000 novih slučajeva (5,2% svih tumora) (3). Preko polovice činili su karcinomi usnice i usne šupljine, nakon kojih su po učestalosti slijedili karcinom grkljana, ždrijela i žlijezda slinovnica (6). Područja koja bilježe najveću pojavnost karcinoma glave i vrata su Južna Azija i Melanezija (najviša stopa incidencije u svijetu, u oba spola), a česti su i u Istočnoj i Zapadnoj Europi te Australiji i Novom Zelandu (6). U Hrvatskoj su 2020. godine zabilježena 894 nova slučaja karcinoma glave i vrata, što je činilo 8% svih tumora i kao takvo premašilo svjetski prosjek (7). Glavni rizični faktori za njihov nastanak su žvakanje proizvoda koji sadržavaju betel-orahe (često u Južnoj Aziji i Melaneziji) (3,5), učestala konzumacija alkohola, pušenje, infekcija humanim papiloma virusom, dijeta siromašna voćem i povrćem te loše održavana higijena usne šupljine (8). Muškarci obolijevaju dva do četiri puta češće od žena (3,5).

Smrtnost od karcinoma glave i vrata je visoka; 2020. godine zabilježeno je 467 125 novih smrtnih slučajeva (6, tablica), odnosno letalitet od oko 50%. Razlog tako visoke smrtnosti je postavljanje dijagnoze u lokalno uznapredovalom stadiju tumora (stadij III i IV) u većini otkrivenih slučajeva (1,9–11), što je njihov najznačajniji (loš) prognostički faktor preživljenja – ono iznosi tek 30-40% (9,10,12). Kasna dijagnoza uglavnom je posljedica rizičnog ponašanja s dugotrajnim posljedicama na zdravlje (pušenja, konzumacije alkohola i sličnog), dugog vremena potrebnog za razvoj značajnih simptoma, čak i kod uznapredovalih tumora, te odgađanja odlaska liječniku od strane pacijenata zbog niske opterećenosti simptomima i vjerovanja da će isti s vremenom proći (12,13). Lokalno uznapredovali tumori zahvaćaju velik broj okolnih struktura, te nose visok rizik od lokalnog povratka i pojave udaljenih presadnica (11,14). S obzirom na navedeno, konvencionalne terapijske strategije, koje uključuju kirurško uklanjanje tumorskog tkiva i/ili radioterapiju i kemoterapiju, rezultiraju značajnom mutilacijom, poteškoćama s fiziološkim funkcijama zahvaćenih organa (smanjenje ili gubitak funkcije barem jednog organskog sustava) i otežanom reintegracijom u društvo (uslijed poremećene slike o vlastitom tijelu, nezadovoljstva estetskim rezultatima operacije te razvoja anksiozno-depresivnih poremećaja). Potraga za manje štetnim modalitetima liječenja rezultirala je uvođenjem imunoterapije u terapijske protokole uznapredovalih karcinoma te izostanak velikih estetskih i funkcionalnih posljedica konvencionalnog liječenja. U ovom će radu biti prikazani principi liječenja karcinoma pločastih stanica imunoterapijskim metodama, najčešće korišteni agensi iz ove skupine lijekova, njihova dostupnost u Hrvatskoj te prednosti i mane s obzirom na ostale terapijske modalitete i općeniti učinak na organizam.

## 2. TUMORSKA IMUNOLOGIJA – OSNOVA ZA IMUNOTERAPIJU

### 2.1. Imunosni odgovor na tumore

Tumorske stanice nastaju uslijed neispravljene greške (mutacije) u genetskom materijalu, posljedično čemu imaju drugačije biološko ponašanje i fenotip (proteinske biljege) od zdravih stranica. Na osnovu te različitosti od zdravih stranica, imunološki sustav prepoznaje ih kao nešto organizmu strano, i radi na njihovom uklanjanju. Najvažniji mehanizmi eliminacije tumorskih stanica su sljedeći:

#### 1. Prirođena imunost

a) NK stanice – prepoznavanje i direktno uništavanje tumorskih stanica zahvaljujući manjku MHC-I površinskih molekula ili obloženosti protutijelima; sposobnost za ubijanje povećavaju im citokini koje luče CD4+ limfociti T (IFN-gama, interleukin 12 i 15).

b) Makrofagi – prepoznavanje i direktno uništavanje tumorskih stanica; služe kao antigen-prezentirajuće stanice (eng. *antigen-presenting cells*, APCs) CD4+ limfocitima T koji ih dodatno aktiviraju lučenjem IFN-gama

#### 2. Stečena imunost

a) Limfociti T – najvažniji zaštitni mehanizam imunosti u odgovoru na tumor; CD8+ limfociti T, još zvani i citotoksični limfociti T (eng. *cytotoxic T-lymphocytes*, CTL), postaju specifični za tumor nakon predočavanja njihovih antigena putem APC-a (i molekula MHC-II), prepoznaju tumorske stanice putem MHC-I molekula te ih uništavaju; CD4+ limfociti T aktiviraju se nakon kontakta s tumorskim antigenima putem MHC-II kompleksa APC-a, te luče citokine potrebne za diferencijaciju naivnih CD8+ limfocita T u CTL, poticanje makrofaga na uništavanje tumorskih stanica te povećanje izražaja MHC-I molekula na tumorskim stanicama.

b) Limfociti B – mogu direktno prepoznati neproteinske antigene na tumorskim stanicama, odnosno u interakciji s CD4+ limfocitima T i proteinske antigene, te na sve navedeno proizvode protutijela koja putem aktivacije komplementa ili reakcije stanične citotoksičnosti (NK stanice, makrofagi) posredovane protutijelima sudjeluju u uništavanju tumorskih stanica.(15,16)

Slijed događanja je takav da tumorske stanice otpuštaju antigene pri svome odumiranju, koje prirodni imunosni sustav prepoznaje kao DAMP-ove (eng. *danger-associated molecular patterns*); stanice prirodne imunosti se pritom aktiviraju i uništavaju tumorske stanice, dok se antigeni prerađuju u APC-ovima. Jedan od tipova APC-a, konvencionalne dendritičke stanice, putuju sustavom limfnih žila do drenirajućeg limfnog čvora, te tamo prezentiraju antigene limfocitima T, s njihovom posljedičnom aktivacijom i ulaskom u cirkulaciju. Limfociti T potom infiltriraju tumorsko tkivo i, kao CTL, ubijaju tumorske stanice.(15,16)

Shodno tome, svaka maligno promijenjena stanica trebala bi biti efikasno prepoznata i uklonjena od strane imunskog sustava. Međutim, eliminacija tumorski promijenjenog tkiva u stvarnosti nije tako jednostavna, što se vidi i iz same činjenice da tumori nastaju i propagiraju unatoč intervencijama imunonadzora te djeluju agresivno na zdravo tkivo, u smislu njegovog uništavanja i vlastitog širenja. Interakcija tumora i imunološkog sustava zapravo je kompleksni, dinamični proces zvan imunouređenje tumora (eng. *immunoediting*, *immune editing*); on obuhvaća selekcijski pritisak, to jest pokušaje suzbijanja rasta i razvoja tumorskih stanica od strane imunonadzora, te reakciju tumorskih stanica na navedeno u vidu razvoja stalno novih fenotipskih obilježja smanjene imunogeničnosti, radi izbjegavanja prepoznavanja i uništenja imunološkim odgovorom. *Immunoediting* odvija se u tri faze – imunsko čišćenje (eng. *immune clearance*), imunosa ravnoteža (eng. *immune balance*) i imunski bijeg (eng. *immune escape*). (15–18)

Faza imunskog čišćenja je najefikasnija u uklanjanju tumorskih stanica; komponente prirodene (NK-stanice, makrofagi) i stečene imunosti (CD4+ i CD8+ limfociti T) prepoznaju i uklanjaju „strane stanice“ visoke antigenosti. Uspješnim uklanjanjem svih tumorskih stanica u prvoj fazi, završava i *immunoediting*; međutim, nije ih uvijek moguće doista u potpunosti eliminirati, posebice one stanice slabije imunogenosti. U tom slučaju započinje faza imunosa ravnoteže, u kojoj tumorske stanice imaju nisku ekspresiju antigena i nije ih lako detektirati i terminirati, no istovremeno im se rast ne otima kontroli uslijed intervencije imunskog sustava (prvenstveno od strane stanica stečene imunosti – CD4+ i CD8+ limfocita T – i njihovih citokinskih produkata, npr. IFN-gama i IL-12). Unatoč naizglednoj uspješnosti u supresiji napretka malignog procesa, u tumorskim se stanicama pod pritiskom neprijateljskog i nepovoljnog okoliša događaju promjene kojima postižu sve manju imunogenost, odnosno sve veću malignost; taj se proces naziva imunsko remodeliranje. Njime maligne stanice nakon određenog vremena uspješno induciraju toleranciju od strane imunskog sustava koji je dotad na njih reagirao, te prelaze u sljedeću fazu *immunoeditinga*, odnosno imunski bijeg. U ovoj fazi, tumorski fenotip je takav da izbjegava prepoznavanje od strane limfocita T, a osim toga se i aktivno suprimira aktivnost imunskih stanica, bilo direktnom interakcijom s njima ili promjenama u tumorskom mikrookolišu (TME, eng. *tumor microenvironment*). Antitumorski imunski odgovor, dakle, postaje disfunkcionalan, te tumor može neometano rasti i širiti se po organizmu. (16,18)

Skraćeno rečeno, tumorsko tkivo evoluiralo velikim brojem mutacija u kratkom vremenu ne bi li postiglo što brži rast i razmnožavanje, steklo sposobnost metastaziranja, otpornost na lijekove i slično, odnosno postiglo što veću biološku agresiju i uspješnije se proširilo organizmom. Za to su tumoru samo donekle dostatne mutacije koje potiču klonalnu ekspanziju, pokretljivost, remodeliranje ekstracelularnog matriksa i druga svojstva intrinzična samim malignim stanicama, s obzirom na to da će te novonastale, od zdravih

izrazito različite maligne stanice, prepoznati i napredak im pokušati suzbiti imunološki sustav. Daljnji opstanak i rast mogući su, dakle, samo ako tumor uspješno izbjegne njegovu intervenciju.

## 2.2. Tumorsko izbjegavanje imunskog odgovora

Izbjegavanje imunonadzora odvija se na tri razine: nemogućnošću efikasnog imunskog odgovora koji bi ubio stanice raka pri njihovom nastanku (odnosno odupiranje tumora staničnoj smrti), pridonosenjem rastu i razvoju tumora disfunkcionalnim imunskim odgovorom te transformiranošću imunskih stanica u tumoru uslijed čega se one ponašaju drugačije od normalnih.<sup>(16)</sup> Pritom je otpornost na staničnu smrt intrinzična samim malignim stanicama, dok druge dvije razine izbjegavanja imunskog odgovora počivaju na tumorskom mikrookolišu (eng. *tumor microenvironment*, TME). [Radi se o dinamičnoj strukturi unutar i u blizini tumorskog tkiva koju većinski oblikuju same maligne stanice; sastoji se od abnormalnih krvnih žila, stromalnih i imunskih stanica te izmijenjenog ekstracelularnog matriksa, a karakteriziraju ga i specifični biokemijski uvjeti (hipoksija, niski pH). U takvim uvjetima imunske stanice bilježe oslabljeno protumorsko djelovanje ili čak promjenu fenotipa u protumorski, zahvaljujući čemu se imunski odgovor na maligne stanice održava neefikasnim.]

### 2.2.1. Otpornost na staničnu smrt

Otpornost na staničnu smrt uzrokovanu stanicama imunskog sustava postiže se smanjenom ekspresijom tumorskih antigena te molekula tkivne podudarnosti, MHC-I (eng. *major histocompatibility complex*). Ovaj mehanizam najvažniji je u ranim fazama razvoja tumora, s tek malim brojem stanica i nerazvijenim mehanizmima za samoočuvanje, samoodržavanje i širenje. Tumorski antigeni mogu biti specifični proteinski produkti tumora (tumor-specifični antigeni), odnosno antigeni prisutni i u netumorskim, ali promijenjene strukture ili ekspresije u tumorskim stanicama (antigeni pridruženi tumoru), nastali uslijed malignih promjena u DNA. Isprva nekritično nastaju i više i manje imunogeni površinski proteini tumorskih stanica, međutim zahvaljujući molekularnoj evoluciji<sup>1</sup> brzo se izdvoje upravo one stanice s najmanje imunogenim mutacijama koje imunski sustav tolerira. Molekule MHC-I služe predočavanju proteinskih produkata stanica na njihovoj površini, i normalno su prisutne kod svih zdravih stanica; u tumorima se njima predočuju promijenjeni tumorski proteini, te ih na osnovu toga kao organizmu strane prepoznaju CD8<sup>+</sup> limfociti T, što potiče njihovu pretvorbu u efektivne citotoksične limfocite koji ih

---

<sup>1</sup> Molekularna evolucija jest mutacijama uzrokovana promjena u genetičkom zapisu koja se očituje u promjeni fenotipa. Ona može biti posljedica selekcije specifičnih molekularnih varijanti pod pritiskom antitumorske aktivnosti imunskog sustava i drugih otežavajućih okolnosti po rast tumora, međutim u velikoj mjeri je i posljedica nasumičnih mutacija (slučajnog genetskog drifta; Motoo Kimura - *The Neutral Theory of Molecular Evolution*, 1983.).

potom uništavaju. Međutim, tumori imaju tendenciju smanjiti izražaj molekula MHC-I na svojoj površini, te tako spriječiti prepoznavanje i aktivaciju CD8+ limfocita T.(16)

## **2.2.2. Tumorski mikrookoliš (TME)**

Tumorski je mikrookoliš dinamična struktura unutar i u blizini tumorskog tkiva koju većinski oblikuju same maligne stanice; sastoji se od abnormalnih krvnih žila, stromalnih i imunskih stanica te izmijenjenog ekstracelularnog matriksa, a karakteriziraju ga i specifični biokemijski uvjeti (hipoksija, niski pH). U takvim uvjetima imunostne stanice bilježe oslabljeno protutumorsko djelovanje ili čak promjenu fenotipa u protumorski, zahvaljujući čemu se potiče rast i razvoj tumora, a imunski odgovor na maligne stanice održava neefikasnim.(19,20)

Imunostne stanice u tumorskom mikrookolišu, kao što je već spomenuto, izmijenjene su u vidu direktnog pridonosa rastu i razvoju tumora te imunosupresivnog djelovanja, odnosno oslabljene protutumorske aktivnosti. Slijedi pregled djelovanja navedenih kategorija imunskih stanica, na osnovu kojeg se suprimira protutumorski imunski odgovor.

### **2.2.2.1. Poticanje rasta i razvoja tumora; imunosupresivno djelovanje**

Najvažniji primjer doprinosa razvoju tumora jest skretanje (polarizacija) makrofaga u tumorskom mikrookolišu, zvanih tumoru pridruženim makrofagima (eng. *tumor-associated macrophages*, TAMs), s M1 na M2 fenotip. M1 stanice (tzv. klasični makrofagi) imaju izraženu protutumorsku aktivnost, dok je M2 fenotip dijametralno suprotan – takvi makrofagi potiču tip II imunostnog odgovora, koji je neefikasan u ubijanju tumorskih stanica, te su u normalnim okolnostima zaduženi za cijeljenje rana i remodeliranje tkiva lučenjem faktora rasta i aktivacijom angiogeneze. U tumorskom mikrookolišu dominiraju upravo stanice M2 fenotipa koje direktno facilitiraju rast tumora, na dva načina: imunosupresivnim učinkom te promjenama TME povoljnima za rast i razvoj tumora. Supresiju protutumorskog imunostnog odgovora M2-TAMs ostvaruju lučenjem imunosupresivnih citokina (TGF- $\beta$ , IL-10) koji smanjuju proliferaciju i aktivnost citotoksičnih limfocita, *checkpoint* inhibicijom citotoksičnih limfocita T, inhibicijom CD4+ limfocita T i antigen-prezentirajućih stanica ekspresijom suprimirajućih MHC-I molekula (HLA-G i HLA-E) te regrutiranjem također imunosupresivnih regulatornih limfocita T ( $T_{reg}$ ) u tumorsko tkivo. Protumorske promjene u tumorskom mikrookolišu uključuju poticanje kronične i neefikasne upalne reakcije koja pogoduje razvoju tumora, poticanje tumorske neoangiogeneze, remodeliranje ekstracelularnog matriksa tumora te poticanje pokretljivosti i invazivnosti malignih stanica, što može dovesti do metastaziranja. Predominaciju fenotipa M2 makrofaga maligne stanice osiguravaju vlastitim regrutiranjem makrofaga u tumorsko tkivo (pomoću citokina poput CSF-1, IL-10, TGF- $\beta$  i CCL2), te indukcijom njihove polarizacije u M2 fenotip.(16,21,22)

Slična polarizacija postoji i u populaciji tumorskih neutrofila (eng. *tumor-associated neutrophils*, TANs), kod kojih se zamjećuju fenotipi N1 i N2. U tumorskom mikrookolišu bogatom inhibitornim citokinom TGF- $\beta$  postoji tendencija skretanja neutrofila s protutumorskog N1 prema protumorskom N2 fenotipu. Potonji promoviraju prvenstveno metastaziranje tumora, pri čemu igraju određenu ulogu u gotovo svakom stadiju nastanka presadnica. Osim toga, luče reaktivne kisikove spojeve izrazito mutagenog djelovanja na maligne stanice, te različite faktore rasta i citokine, tako podržavajući rast i razvoj tumora.(23,24)

U podržavanju rasta tumora važni su i regulatorni limfociti T ( $T_{reg}$ ). Radi se o CD4+ limfocitima T koji u normalnim okolnostima imunosupresijom kontroliraju opseg imunosne reakcije i induciraju toleranciju imunosnih stanica na vlastite antigene, kako bi se uspješno uklonili patogeni te istovremeno zdravo tkivo očuvalo od štete. U tumorskom ih je tkivu prisutno puno više nego što je uobičajeno za kontrolu imunosne reakcije; tako osiguravaju stalnu prevagu antitumorske imunosupresije. Mehanizmi kojima to postižu su sljedeći: ekspresija CTLA-4 i PD-1, koji interferiraju sa sposobnošću antigen-prezentirajućih stanica da aktiviraju limfocite T; ekspresija IL-2R $\alpha$  s visokim afinitetom za IL-2, čime ga efektivno oduzimaju limfocitima T kojima je IL-2 potreban za aktivaciju i preživljenje; lučenje imunosupresivnih citokina IL-10 i TGF- $\beta$ ; direktno uništavanje imunosnih stanica pomoću granzima i perforina. Regulatorni limfociti T u tumorskom se mikrookolišu nađu slično već spomenutim M2 makrofagima – kako vrlo aktivnom regrutacijom iz limfnog tkiva, tako i povećanom pretvorbom iz nespecijaliziranih CD4+ limfocita T. Prisutnost Treg stanica u PHD nalazu tumorskog tkiva stoga je obično loš prognostički pokazatelj.(16,25–28)

Supresorske stanice mijeloidnog porijekla (MDSC, eng. *myeloid-derived suppressor cells*) poseban su tip transformiranih neutrofilnih polimorfonukleara i mononukleara; one nastaju u uvjetima kronične upale i stalnoj izloženosti citokinima i faktorima rasta (IL-6, IL-1 $\beta$ , GM-CSF, M-CSF) te ih karakterizira izrazito imunosupresivno djelovanje koje doprinosi tumorskom izbjegavanju imunonadzora. Razlikujemo polimorfonuklearne (PMN) i mononuklearne (M) MDSC stanice, čija se rasprostranjenost u tumorima i limfnom tkivu te mehanizmi imunosupresije ponešto razlikuju. Međutim, djelovanje obiju tipova stanica svodi se na proizvodnju imunosupresivnih solubilnih molekula (peroksinitrita, dušikovog oksida, reaktivnih kisikovih vrsta, citokina IL-10 i TGF- $\beta$ ), depleciju aminokiselina esencijalnih za preživljenje limfocita T (L-arginin, cistein) te ekspresiju liganda inhibitornih *checkpoint* receptora (PD-L1, CTLA-4). (29–31)

### 2.2.2.2. Oslabljena protutumorska aktivnost

Oslabljeno djelovanje limfocita T, glavnih efektora u uništavanju malignih stanica, ključni je element tumorskog izbjegavanja imunskog odgovora. Jedan vid njihove oslabljene aktivnosti jest iscrpljenost limfocita T (eng. *T-cell exhaustion*), disfunkcionalno stanje karakterizirano izostankom adekvatne aktivacije pri dodiru s antigenom (odnosno proliferacije i pokretanja efektorskih funkcija). Do njega dolazi uslijed kronične stimulacije protumorigenim antigenima, *checkpoint* inhibicije (iscrpljeni limfociti izražavaju povećanu količinu inhibitornih receptora PD-1 i CTLA-4), djelovanja immunosupresivnih solubilnih molekula u tumorskom mikrookolišu (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35, IDO itd.) te nedostatka za rast i aktivaciju potrebnog interleukina 2.(16,32)

Funkcija limfocita B također je narušena promijenjenim djelovanjem stanica tumorskog mikrookoliša. T<sub>reg</sub> suprimiraju aktivnost te granzimima direktno uništavaju aktivirane limfocite B koji služe kao antigen-prezentirajuće stanice; MDSC (vidi dalje za objašnjenje) luče IL-7 koji smanjuje proizvodnju specifičnih protutijela, a same tumorske stanice potiču njihovu transformaciju u regulatorne limfocite B (B<sub>reg</sub>) koji promoviraju tumorsku progresiju i metastaziranje. Osim toga, proliferacija limfocita B specifičnih za tumorske antigene inhibirana je sustavom *checkpoint*-inhibicije (primarno molekulama PD-L1/PD-1 i CTLA4/CD80 i CD86) od strane tumorskih stanica i regulatornih limfocita T.(16)

Aktivnost klasičnih antigen-prezentirajućih stanica, odnosno dendritičkih stanica, također je promijenjena, u smislu smanjenog prikazivanja antigena limfocitima T, direktne inhibicije djelovanja citotoksičnih limfocita T (*checkpoint* inhibicijom, indukcijom anergije uslijed manjka kostimulatornih molekula) te poticanja diferencijacije limfocita T u regulatorni podtip. Sve navedeno posljedica je djelovanja tvari koje luče tumorske i druge stanice tumorskog mikrookoliša (T<sub>reg</sub>, MSCD); one mogu spriječiti i samu diferencijaciju dendritičkih stanica iz mijeloidnih prekursora, usmjeravajući ih prema nastanku MSCD ili M2-TAM stanica.(33–35)

Disfunkcija NK-stanica uzrokovana je immunosupresivnim tvarima koje luče TAMs, MDSCs i T<sub>regs</sub> (IDO, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6), deplecijom IL-2 od strane T<sub>regs</sub>, *checkpoint* sustavom inhibicije (povećana ekspresija inhibitornih receptora PD-1 i CTLA-4 na NK-stanicama, odnosno njihovih liganda na tumorskim i drugim stanicama TME) te kontaktom s inhibitornim MHC-II molekulama izraženima na površini tumorskih stanica (HLA-G i HLA-E).(36,37)

Za tumore glave i vrata specifičan je obilan imunski infiltrat i vrlo imunsko aktivan tumorski mikrookoliš; detalji o imunskim karakteristikama tumora glave i vrata i njihovom značenju u terapiji navedeni su u 5. poglavlju.

S obzirom na to da je poremećaj protutumorske aktivnosti imunskog sustava jedan od glavnih faktora uspješnog napredovanja malignog procesa, bez kojeg bi tumorske stanice brzo bile prepoznate kao abnormalne i uništene, nametnula se misao da su gore navedeni mehanizmi dobra meta za nove terapijske mogućnosti. Smislenost ovog pristupa podupiru dokazi da se rast tumora može uspješno usporiti i/ili zaustaviti manipulacijom imunskog sustava – prvi takav bio je pokus američkog kirurga i znanstvenika Williama Coleyja, koji je primijetio smanjenje inoperabilnog sarkoma nakon injiciranja mješavine bakterijskih toksina (tzv. Coleyjevog toksina) u tumorsko tkivo.<sup>(38)</sup> Od Coleyjevog doba (19. stoljeće) do danas provedena su mnoga istraživanja s rezultatnim detaljnim poznavanjem ponašanja imunskih stanica u tumorskom mikrookolišu, kao i interesom za njihovim iskorištavanjem u borbi protiv tumora. Tip liječenja koji radi po ovom principu naziva se imunoterapijom.



### 3. IMUNOTERAPIJA

Do prije dvadesetak godina, glavne terapijske strategije za liječenje tumora općenito, pa tako i karcinoma glave i vrata, bile su kirurško liječenje, kemoterapija, radioterapija i ciljano liječenje. Prva tri tipa terapije ostavljaju velike posljedice po organizam – ekstenzivno kirurško liječenje lokalno uznapredovalih karcinoma uzrokuje značajne mutilacije, a kemoterapija i radioterapija, uz tumorske stanice, oštećuju i zdrava tkiva – dok se na ciljanu terapiju (npr. rituksimab, trastuzumab itd.) često razvije rezistencija.(16) S obzirom na navedene manjkavosti, pojavila se potreba za razvojem onkološkog liječenja čijoj učinkovitosti u liječenju tumora one ne bi bile suprotstavljene. Krajem 20. te početkom 21. stoljeća u upotrebu se uvodi upravo jedan takav novi terapijski modalitet – imunoterapija – s ciljem modificiranja tijeka bolesti ranom primjenom, ograničavanja komplikacija konvencionalnog liječenja i pružanja mogućnosti liječenja refraktornih bolesti.(39)

Imunoterapija se u literaturi često naziva i biološkom terapijom, uslijed toga što modulira biološke procese u organizmu te na taj način utječe na aktivnost bolesti.(39) Konkretno, imunoterapija tumora obuhvaća sistemske lijekove koji djeluju na imunosni sustav potičući ga na prepoznavanje nastajućeg ili već postojećeg malignog procesa te povećavajući njegovu učinkovitost u borbi protiv tumora.(40) To je neobično važno upravo stoga što imunološki sustav ima ulogu kako u uklanjanju tumorskih stanica, tako i u promicanju njihovog rasta i razvoja te njihovom remodeliranju ne bi li im se smanjila imunogeničnost – dakle, potreban je terapijski modalitet koji bi osigurao prevladavanje protutumorskog djelovanja imunosnog sustava.(16)

Danas postoji velik broj do molekularne razine poznatih mehanizama kojima tumori izbjegavaju imunosni odgovor, i svi su oni potencijalne točke djelovanja protutumorske imunoterapije. Dosad je u kliničku upotrebu ušlo petnaestak imunoterapeutika.(41) Prema mehanizmu djelovanja mogu se podijeliti u šest skupina:

#### **1. Imunosni checkpoint inhibitori**

*Checkpoint* inhibitori posebna su vrsta protutumorskih monoklonalnih antitijela sa svrhom blokiranja imunosnih *checkpointova*, čija je fiziološka funkcija umjerena suprimacija imunološkog odgovora kako ne bi došlo do oštećenja zdravog tkiva.(42–44) Tumorsko pak tkivo iskorištava ovaj način kontroliranja opsega imunosne reakcije za zaustavljanje imunosnog odgovora protiv sebe,(42–44) te se blokiranjem ovog imunosuprimirajućeg mehanizma onemogućuje inaktivacija limfocita T odnosno proliferacija stanica Treg fenotipa, od strane tumorskih ili pak imunosnih stanica u tumorskom mikrookolišu, čime se postiže jači protutumorski odgovor.(43,45,46)

## **2. Adoptivna imunoterapija (terapija prijenosa limfocita T)**

Radi se o autolognim limfocitima T koji se nakon određenih *in vitro* postupaka što facilitiraju učinkovitost njihovog odgovora na tumorske stanice vraćaju natrag u pacijentovo tijelo.(17,43,44) Jedan oblik ovog terapijskog koncepta su tzv. limfociti koji infiltriraju tumor (eng. *tumor-infiltrating lymphocytes*, TILs) izolirani iz tumorskog tkiva pacijenta i već specificirani za prepoznavanje tumorskih antigena, koji se *in vitro* umnožavaju i aktiviraju te se potom vraćaju pacijentu.(17,44) Najmoderniji i najnoviji tip su pacijentovi limfociti T koji su *in vitro* genetički modificirani tako da na svojoj površini izražavaju sintetski imunosni receptor specifičan za antigene na tumorskim stanicama, ali neovisan o MHC-sustavu prezentiranja antigena; te se stanice nazivaju CAR-T stanicama (eng. *chimeric antigen receptor T*).(16,17,42,45) Po ponovnoj administraciji pacijentu, one mogu prepoznati ciljani antigen na tumorskim stanicama i inducirati njihovu smrt.(45)

## **3. Antitumorska monoklonalna antitijela**

Ova se skupina imunoterapeutika razlikuje od *checkpoint* inhibitora po svojim ciljnim molekulama – meta antitumorskih antitijela su specifične molekule na površini tumorskih stanica, te se vezanjem na njih pokreću mehanizmi uništavanja malignih stanica na razne načine.(43–45) Postoje tri podtipa antitumorskih antitijela: tzv. gola (nemaju vezanu molekulu na svom Fc fragmentu; vezanjem na specifične tumorske antigene pokreće se reakcija citotoksičnih stanica, fagocita i sustava komplementa, odnosno inhibira vezanje faktora rasta na odgovarajuće receptore),(43–45) konjugirana (na Fc fragmentu nose vezane kemoterapeutike ili radioaktivne čestice, radi preciznijeg dostavljanja terapije u tumorsko tkivo i smanjenja štete po zdravo tkivo)(47,48) te bispecifična (vežu dva proteina istovremeno; najčešće se radi o jednom tumorskom antigenu i površinskom proteinu limfocita T, čime se omogućava bliski kontakt limfocita s malignom stanicom i facilitira reakcija limfocita na nju).(40,44,49,50)

## **4. Cjepiva protiv tumora**

Cjepiva protiv tumora uključuju unošenje imunogenične supstance u organizam koja će izazvati specifični imunosni odgovor (konkretno, djelovanje limfocita T) na tumore.(43,45) Terapijska cjepiva sadržavaju dendritičke stanice pacijenta modificirane tako da izražavaju tumorske antigene, nukleinske kiseline (tumorska DNA ili mRNA) odnosno tumorske neoantigene.(44,51,52) Izuzev toga, kod ranih stadija karcinoma mokraćnog mjehura česta je intravezikalna primjena BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) cjepiva, koje ne sadrži tumorske antigene, već samo pokreće imunosnu reakciju što, između ostalog, uklanja i maligne stanice.(45,53) Preventivna cjepiva, s druge strane, štite od onkogenih virusa poput humanog papiloma virusa te virusa hepatitisa B.(43)

## **5. Imunosni modulatori**

Ova se skupina imunoterapeutika sastoji od citokina – interferona, interleukina, i čimbenika rasta kolonija granulocita i monocita (eng. *granulocyte–macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF)(41,44) koji direktno stimuliraju aktivnost imunskog sustava, potičući izražaj MHC i kostimulatornih molekula, aktivaciju limfocita T i ostalih imunosnih stanica, njihovu proliferaciju i slično.(41,45) Citokini su najraniji oblik imunoterapije (rekombinantni interferon alfa odobren je za kliničku upotrebu 1986. godine).(41)

## **6. Onkolitički virusi**

Onkolitički su virusi genetički modificirani mikroorganizmi, najčešće iz rodova Herpesvirusa, Poliovirusa, Reovirusa i Parvovirusa, koji selektivno inficiraju i razmnožavaju se u tumorskim stanicama.(40,43) Pritom dovode do lize tumorskih stanica, pojačane ekspresije tumorskih antigena u svrhu efikasnijeg prepoznavanja malignih stanica od strane imunskog sustava te mobiliziranja imunosnih stanica u tumorskom tkivu i poticanja njihovog protutumorskog djelovanja(16,40,43), a mogu služiti i kao vehikuli za ekspresiju imunomodulatornih citokina, čime se postiže veća selektivnost u njihovom djelovanju te smanjuju sistemski učinci.(40)

## 4. IMUNOSNE CHECKPOINT MOLEKULE

Imunosne kontrolne točke (eng. *immune checkpoints*) sudionici su svih imunskih reakcija, u kojima se pojavljuju simultano s kostimulativnim molekulama. Njihova je zadaća kontrola ulaska u imunsku reakciju, stoga ih se još naziva i „vratarima“ imunskog odgovora (eng. *gatekeepers of immune responses*).<sup>(54)</sup> Radi se o molekulama smještenima na površini stanica imunskog sustava (poglavito limfocita T i antigen-prezentirajućih stanica) koje prilikom izlaganja antigena limfocitima T suprimiraju imunološku reakciju.<sup>(55)</sup> Njihovo djelovanje stoga rezultira tzv. perifernom tolerancijom na antigene (suprotstavljena mu je centralna tolerancija, koja obuhvaća uklanjanje autoreaktivnih ili na druge načine neadekvatnih nezrelih limfocita T u timusu) koja ima višestruke uloge:

1. Induciranje tolerancije na vlastito odnosno autotolerancije (eng. *self-tolerance*) pri aktivaciji naivnih limfocita T u limfnim čvorovima, kako bi se spriječila autoimunska reaktivnost;
2. Detekcija eventualno promaklih autoreaktivnih limfocita T u započetim imunološkim reakcijama u organizmu;
3. Kontrola opsega reakcije na strane antigene, u svrhu sprječavanja prejakog imunskog odgovora i kolateralnog oštećenja vlastitog zdravog tkiva.

Danas su poznate brojne molekule koje pripadaju sustavu imunskih kontrolnih točaka (CTLA-4, PD-1, LAG3, TIM3, TIGIT, BTLA, VISTA, GITR, KIR).<sup>(54,56)</sup> Najekstenzivnije istražene i od najvećeg kliničkog značaja su molekule CTLA-4 (eng. *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) i PD-1/PD-L1 (eng. *Programmed death 1/Programmed death ligand 1*).<sup>(57)</sup>

### 4.1. CTLA-4

CTLA-4 smatra se vodećom imunskom kontrolnom točkom zbog svog djelovanja prilikom aktivacije naivnih (s antigenima još nesusrelih) limfocita T u limfnim čvorovima.<sup>(16,17,58)</sup> Tamo naivni limfociti T prolaze proces aktivacije u interakciji s antigen-prezentirajućim stanicama (dendritičkim stanicama, limfocitima B i makrofagima). Ona se odvija na molekularnoj razini između T-staničnog receptora i MHC-II molekule, čime receptor limfocita T dolazi u dodir sa specifičnim antigenom, te obaveznom istovremenom prisutnošću kostimulativnih signala u obliku vezanja molekula CD80 odnosno CD86 antigen-prezentirajućih stanica i molekule CD28 limfocita T. Kostimulacija osigurava proliferaciju aktiviranih limfocita T, povećano preživljenje i diferencijaciju putem proizvodnje citokina IL-2.<sup>(58)</sup> U slučaju njezina izostanka dolazi do razvoja tzv. anergije, generalizirane inhibicije proliferacije i efektorskih funkcija limfocita T (proizvodnja citokina, citotoksičnost) te smanjenog preživljenja.<sup>(59)</sup>

Kostimulacija može biti nedostatna zbog nedovoljne količine kostimulatornih signala ili uslijed jakih koinhibitornih signala; CTLA-4 signalni put pripada potonjem te djeluje kao kompetitivni inhibitor receptora CD28.(43,58) Naime, CTLA-4 je izražen na limfocitima T i veže iste ligande (CD80 i CD86) 10 do 100 puta većim afinitetom,(16) čime sprječava njihovo vezanje na CD28. U slučaju da je relativno više liganada vezano na CTLA-4 nego na CD28, inducirat će se anergija naivnih limfocita T.(58) Osim navedenog mehanizma, postoje dokazi da CTLA-4 može smanjiti ekspresiju CD28 na limfocitima T,(54) a unutarstanična signalna kaskada pokrenuta vezanjem CTLA-4 i CD80-86 ometati onu pokrenutu interakcijom CD28/CD80-86.(57,58)

CTLA-4 je inducibilno izražen na efektornim limfocitima T (CD8+ citotoksični limfociti), što znači da se u slučaju neaktiviranih limfocita nalazi uskladišten intracelularno, a njegovu translokaciju na površinu stranice inducira upravo vezanje T-staničnog receptora na MHC-molekule odnosno kostimulatorni signali; na taj se način formira povratna veza kojom se kontrolira opseg i jačina imunološke reakcije. Za razliku od efektorskih, regulatorni limfociti T ( $T_{reg}$ ) konstitutivno izražavaju CTLA-4 koji pojačava njihovu inhibitornu funkciju, a može se naći i na CD4+ pomoćničkim limfocitima T čiju aktivnost suprimira.(57,58,60)

#### 4.2. PD-1

PD-1 polučuje slične učinke kao CTLA-4, samo drugačijim mehanizmima. Izražen je inducibilno na limfocitima T i B te mijeloidnim (NK) stanicama; pojavljuje se na njihovoj površini prilikom kontakta s antigenom (odnosno pri interakciji TRC/BRC i MHC-II molekule) te veže ligande zvane PD-L1 i PD-L2 (eng. *Programmed Death Ligand 1 and 2*). (43,55,58) Pritom se prekida aktivacijska signalna kaskada koja kreće od limfocitnog receptora vezanog na antigen, inhibira potrošnja glukoze, proizvodnja citokina i proliferacija, odnosno limfociti se dovode do stanja anergije. Izražaj PD-1 je karakteristika tzv. iscrpljenih citotoksičnih limfocita T (eng. *'exhausted' T-cells*), koji nastaju uslijed visokih razina stimulacije ili smanjene pomoći od strane CD4+ limfocita T (pri npr. kroničnim infekcijama ili malignim bolestima).(56,58) Za to stanje je tipična disfunkcija zahvaćenih limfocita, s posljedičnom manjkavom kontrolom infekcija i tumorskih bolesti.(32,61) Osim toga, moguća je posljedica i direktno izazivanje apoptoze limfocita. Novija istraživanja pokazuju i da se PD-1 ligandi mogu vezati i na molekulu B7-1 (CD80), koja se prethodno smatrala ekskluzivnim ligandom molekula CD80/CD86 s posljedičnim kostimulatornim signalom, odnosno *checkpoint* molekule CTLA-4. Pritom se također postiže koinhibitorni učinak.(62)

Za razliku od CTLA-4, koji izaziva anergiju limfocita T pri njihovoj aktivaciji u limfnom tkivu, PD-1 signalni put isto čini u efektorskoj fazi već aktiviranog i za antigen specifičnog limfocita T, pretežno u perifernim tkivima tijekom pokrenute imunodne reakcije – dakle, smanjuje opsežnost T-staničnog odgovora stanica koje su već ušle u imunodnu reakciju. (17,58,60) Razlika postoji i u rasprostranjenosti molekula; osim šire rasprostranjenosti molekule PD-1 navedene prethodno u tekstu, što ukazuje na mogućnost inhibicije djelovanja šireg spektra stanica osim citotoksičnih limfocita T, njegove ligande nalazimo ne samo na profesionalnim antigen-prezentirajućim stanicama (kao što je to slučaj s CD80/CD86) već i na drugim leukocitima te nehematopoetskim i nelimfoidnim tkivima (npr. epitelnim i endotelnim stanicama), a ekspresija im se može i inducirati na parenhimnim te malignim stanicama pomoću citokina odnosno tumorigenim signalnim putevima.(57,58)

Uloga PD-1 u regulatornih limfocita T, koji ga također mogu eksprimirati, nije u potpunosti jasna – nađeno je da doprinosi proliferaciji T<sub>reg</sub> stanica te konverziji naivnih CD4<sup>+</sup> limfocita T u regulatorne limfocite T, odnosno potiče skretanje iz efektorskog u imunosuprimirajući fenotip.(43,55,58)

Imunodne su kontrolne točke, dakle, neophodne za zaštitu od autoimunodnih fenomena i prejake, za organizam štetne imunološke reakcije. Međutim, oni također predstavljaju idealno sredstvo imunodnog bijega za brojne vrste tumora. Korištenjem ovih mehanizama, tumorske stanice osiguravaju inaktivaciju efektorskih i za njih opasnih stanica imunodnog odgovora, te na taj način osiguravaju svoje preživljenje i neometanu daljnju proliferaciju. Navedeni je učinak potenciran time što *checkpoint* molekule ne izražavaju samo maligne, već i druge stanice tumorskog mikrookoliša, uključujući i imunološke stanice promijenjenih fenotipa i rezultatnog protumorskog djelovanja.

Uzevši u obzir tu spoznaju, kao potencijalna strategija u liječenju tumora nametnula se blokada upravo imunodnih kontrolnih točaka, čime bi se spriječila inaktivacija protutumorskog imunodnog odgovora i opstanak malignih stanica. Ova se strategija smatra revolucionarnom iz više razloga – preusmjerila je terapijski cilj s uništavanja samih malignih stanica na modulaciju tumorskog imunodnog mikrookoliša i poticanje njegove aktivnosti, učinivši tako pristup liječenju tumora cjelovitijim;(63) višestruko je povećala postotak preživljenja pacijenata uključenih u klinička ispitivanja;(64) njezino djelovanje omogućuje dugotrajnu remisiju unatoč prekidu primjene lijeka.(63) Njezin se razvoj odvijao strelovitom brzinom; od otkrića molekula CTLA-4 i PD-1 1987. odnosno 1992. godine do prvih kliničkih studija s lijekovima čije su oni mete prošlo je samo petnaestak godina.(65,66) Ti su novi lijekovi nazvani blokatorima/inhibitorima imunodnih točaka; radi se o monoklonskim protutijelima koji selektivno vežu CTLA-4 i PD-1/PD-L1, tako omogućujući reaktivaciju protutumorskog imunodnog odgovora.(45,46) Prvi

od Agencije za hranu i lijekove (*Food and Drug Agency*, FDA) odobren inhibitor imunskih kontrolnih točaka bio je ipilimumab 2011. godine, za liječenje metastatskog melanoma.(64,65) Ubrzo nakon, razvijeni su inhibitori molekule PD-1 (pembrolizumab i nivolumab) te PD-L1 (atezolizumab i durvalumab).(64) Danas je odobreno, i u kliničkoj praksi korišteno, 8 lijekova ove skupine za širok spektar malignih bolesti. U terapiji karcinoma glave i vrata koriste se dva PD-1 inhibitora: nivolumab i pembrolizumab.

## 5. TUMORSKI MIKROOKOLIŠ I IZBJEGAVANJE IMUNOSNOG ODGOVORA U TUMORIMA GLAVE I VRATA

Tumore glave i vrata karakterizira jedan od najobilnijih imunskih infiltrata u tumorskom mikrookolišu u usporedbi s drugim tumorima. S obzirom na to, pretpostavljeno je da bi imunoterapija kod njih postigla značajan učinak, za razliku od konvencionalnih modaliteta liječenja koji su unatoč sve sofisticiranijim metodama i lijekovima rezultirali visokom smrtnošću i stopom recidiva.(56,67) Naime, genetski materijal tumora glave i vrata je izuzetno nestabilan i mutagen, što rezultira visokim postotkom neoantigena na malignim stanicama, a upravo na njih imunski sustav najburnije reagira (za razliku od reakcije na preeksprimirane nemutirane nativne proteine, na koje je reakcija puno slabija); uz to, HPV+ tumori i nazofaringealni karcinomi eksprimiraju i virusne antigene. Zbog toga njihov tumorski mikrookoliš obiluje limfocitima T koji infiltriraju tumor (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs), posebno u slučaju HPV+ tumora, a za visoku je infiltraciju CD8+ limfocitima te NK stanicama pokazana snažna korelacija s povećanim preživljenjem.(68) Primjenom imunoterapije koja bi potaknula već ionako buran imunski odgovor i maksimalno iskoristila potencijal u tumorskom tkivu prisutnih imunskih stanica, prema svemu navedenom, trebao bi se postići optimalan terapijski rezultat.

Međutim, tumori posjeduju specifičnu neimunogenu, dugoživeću staničnu liniju koja preživljava sve faze imunskog uređivanja te se konstantno mijenja ne bi li postigla optimalan fenotip za neometani rast i razvoj – radi se o tumorskim matičnim stanicama (*Cancer Stem Cells, CSCs*).(67) Ove stalno mutirajuće maligne stanice razvile su brojne strategije izbjegavanja imunskog odgovora; posljedična ravnoteža između imunopermisivne i imunosupresivne aktivnosti u tumorskom mikrookolišu određuje rezultatni imunski odgovor i agresivnost samog tumora.(56,67) To s jedne strane govori da ni gore opisani snažan imunski odgovor ne štiti u potpunosti od razvoja i progresije tumora, ali s druge strane daje nadu u razvoj novih strategija imunoterapijskog tipa, koje bi onemogućile izbjegavanje protutumorske imunosti i potaknule neometan rad bogatog imunskog infiltrata. Slijedi kratki pregled mehanizama kojima se stanice tumora glave i vrata koriste u supresiji protutumorske aktivnosti imunskih stanica, a koji su istovremeno i potencijalne mete za imunoterapeutike; isto se može vidjeti i na Slici 2.(56,67,68)

### 1. Proizvodi tumorskih stanica

Maligne stanice tumora glave i vrata same proizvode cirkulirajuće molekule koji suprimiraju rad citotoksičnih limfocita T, a s druge strane mijenjaju izražaj antigena, ometajući tako i limfocitni i odgovor NK stanica. Radi se o imunosupresivnim citokinima (TGF- $\beta$ , IL-6, IL-10) koji inhibiraju proliferaciju i



efektorske funkcije limfocita T, te indolamin-2,3-dioksidogenazi koja depletira triptofan, ključnu aminokiselinu potrebnu za umnožavanje i aktivaciju limfocita T.

## 2. Izmjena signalnih puteva

Jedna od dobro poznatih i često upotrebljivanih strategija za izbjegavanje imunskog odgovora jest smanjenje izražaja MHC-I molekula što nose tumorske proteine na površini malignih stanica, čime bi se spriječilo njihovo prepoznavanje i uništavanje citotoksičnim limfocitima T. Međutim, smanjeni izražaj MHC-I molekula kao organizmu strano i potencijalno opasno detektiraju NK stanice, što naposljetku ipak dovodi do uništenja malignih stanica. Kako bi to izbjegle, stanice tumora glave i vrata induciraju promjene u genima za procesiranje i prezentaciju neoantigena, rezultirajući nedostatkom ili smanjenom količinom njihovih proteinskih produkata (npr. nedostatkom STAT1 proteina). Tako se ometa prezentiranje tumorskih neoantigena bez potrebe za smanjenjem izražaja antigen-prezentirajućih molekula.

## 3. Imunosne kontrolne točke

Točna funkcija i mehanizam djelovanja dviju najistraženijih molekula imunskih kontrolnih točaka, PD-1/PD-L1 i 2 te CTLA-4, kao i njihov izražaj na pojedinim tipovima stanica u tumorskom mikrookolišu, objašnjeni su u prethodnom odjeljku pod nazivom „IMUNOSNE CHECKPOINT MOLEKULE“. Tumori glave i vrata u do 60% slučajeva pokazuju pojačan izražaj PD-1 i PD-L1 molekula kako na malignim, tako i na imunskim stanicama u tumorskom tkivu; izražaj PD-1 i PD-L1 jači je u limfocita koji infiltriraju tumor (*tumor-infiltrating lymphocytes*, TILs) nego na onima u perifernoj krvi. PD-1 signalni put je povezan s indukcijom iscrpljenosti limfocita, koja obuhvaća njihovo smanjeno stvaranje citokina i liziranje ciljnih stanica te promjenu njihove pokretljivosti, kao i indukcijom prelaska u T<sub>reg</sub> fenotip. Izražaj CTLA-4 molekula promijenjen je u tumorskom mikrookolišu na sličan način kao onaj PD-1 molekula; također su jače eksprimirane na tumorskim T<sub>reg</sub> stanicama.

## 4. Kostimulatorne molekule

Kostimulatorne molekule promoviraju reakciju i tumoricidnost imunskih stanica pri susretu s malignom stanicom. U slučaju njihovog nedostatka pri prezentaciji antigena, imunosne stanice prelaze u anergično stanje i postaju tolerantne na tumorske stanice. Tumori glave i vrata iskorištavaju ovaj mehanizam u vidu smanjene ekspresije određenih kostimulatornih molekula, poput Ox40L i CD137.

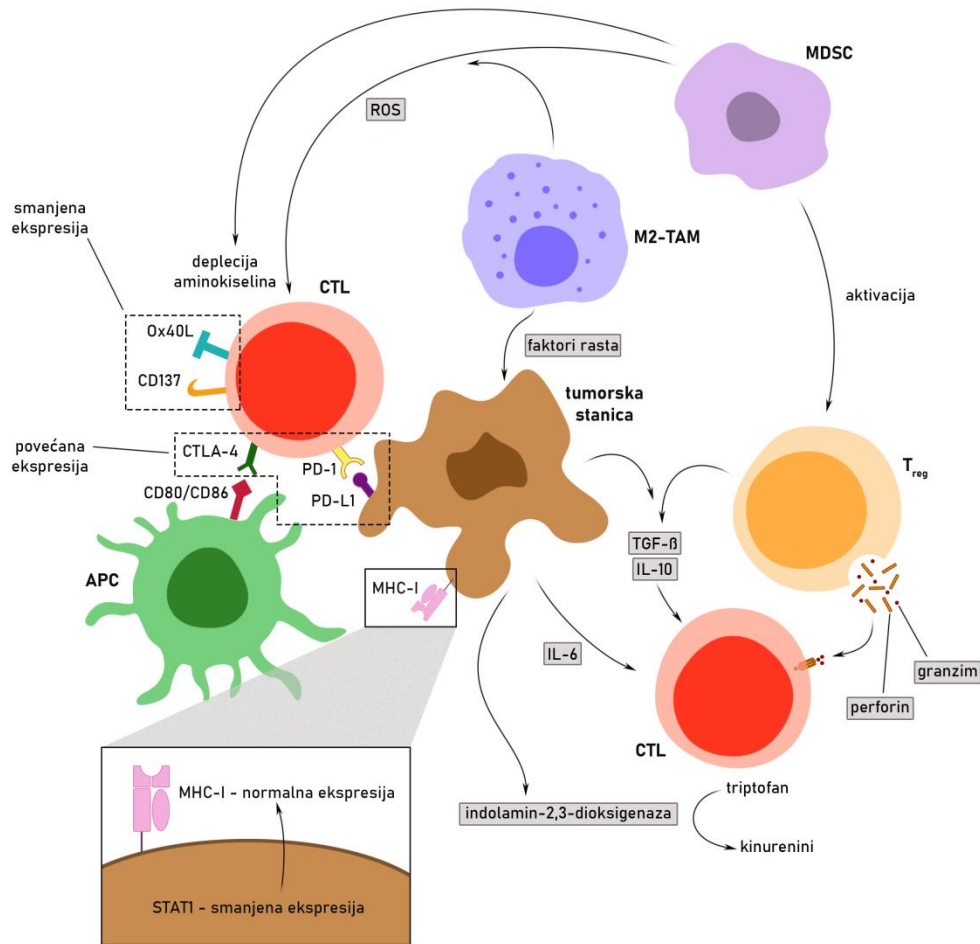
## 5. Stanice tumorskog mikrookoliša: T<sub>reg</sub>, TAM, MDSC

U prethodnim odlomcima bilo je riječi o načinima supresije aktivnosti u tumorskom tkivu prisutnih imunskih stanica protutumorske dispozicije; osim ove strategije, maligne stanice imaju i sposobnost regrutiranja i regulacije imunosupresivnih staničnih populacija koje propagiraju tumorski rast i razvoj. Radi se o regulatornim limfocitima T ( $T_{reg}$ ), supresorskim stanicama mijeloidnog porijekla (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) i makrofagima povezanim s tumorom (*tumor-associated macrophages*, TAMs).

Regulatorne limfocite T u tumorskom mikrookolišu čine dvije populacije stanica – one prirodne, nastale u timusu i naknadno regrutirane u tumorsko tkivo, te inducibilni  $T_{reg}$  limfociti koji nastaju djelovanjem tumorskog citokinskog profila na u tamošnjem tkivu već postojeće limfocite T.  $T_{reg}$  inhibiraju imunosne funkcije drugih stanica putem imunosupresivnih citokina IL-10 i TGF- $\beta$  te imunosnih molekula kontrolnih točaka, a mogu i direkto uništavati CD8+ limfocite T i NK stanice pomoću granzima i perforina. Njihova je prisutnost najčešće veća u HPV+ tumorima glave i vrata, što rezultira smanjenim CD8+/Treg omjerom unatoč bogatstvu CD8+ limfocitnog infiltrata. Paradoksalno, prognoza je ovih tumora povoljnija – smatra se da je tome tako jer prisustvo Treg potencijalno ukazuje na postojeći aktivni (premda suprimirani) imunski odgovor u tumoru.

Supresorske stanice mijeloidnog porijekla su nezrela mijeloidna stanična linija koja se također regrutira, a u *in vitro* uvjetima se njihov nastanak može i inducirati u tumorskom tkivu. Glavno imunosupresivno djelovanje ove stanice postižu lučenjem enzima koji depletiraju za imunosne stanice ključne metabolite (konkretno, aminokiseline L-arginin, triptofan i cistein) te proizvodnjom reaktivnih kisikovih spojeva što direktno oštećuju imunosne stanice. Osim toga, MDSCs mogu prezentirati neoantigene već specifičiranim limfocitima T, što rezultira nitracijom T-staničnog receptora i posljedičnom nemogućošću stimulacije limfocita T pri interakciji s antigen-prezentirajućim stanicama. Također potiču proliferaciju i aktivaciju regulatornih limfocita T te izražavaju imunosne molekule kontrolnih točaka, čime prvenstveno koče aktivnost efektorskih limfocita T.

Makrofagi povezani s tumorom fenotipa M2 promoviraju tumorski rast i razvoj direktno, secernirajući faktore rasta, te indirektno, imunosupresivskim mehanizmima sličnima onima koje koriste MDSCs. Tumori glave i vrata reguliraju svoj mikrookoliš uvećavajući broj makrofaga M2 tipa, nauštrb antitumorskog M1 tipa, što je povezano s lošijom prognozom.



**Slika 2. Tumorska imunost u karcinomima glave i vrata**

Svi gore navedeni mehanizmi izbjegavanja imunskog odgovora, zahvaljujući kojima su tumori glave i vrata toliko agresivni i teški za liječiti, pokazuju potencijal efikasnijeg i manje po organizam štetnog liječenja imunoterapijskim metodama. Provođi se velik broj studija u kojima se analiziraju moguće mete novih terapijskih monoklonalnih antitijela kojima bi se liječili ovi tumori; primjerice, već uhodane i u terapijama raznih tipova malignih bolesti iskorištene imunostne molekule kontrolnih točaka (PD-1, PD-L1 i CTLA-4), novije otkrivene *checkpoint* molekule (LAG-3, TIM-3, TIGIT i slične), kostimulatorne molekule (4-1BB, Ox40, CD40) i imunosupresijske stanice u tumorskom mikrookolišu, kao i njihovo kombiniranje s drugim terapijskim modalitetima. Osim toga, u razvoju su i druge imunoterapijske metode, poput terapije onkolitičkim virusima, protutumorska cjepiva i adoptivna imunoterapija. Trenutno, odobrenje FDA-a za liječenje karcinoma glave i vrata imaju samo dva lijeka – monoklonalna antitijela specifična za PD-1 molekulu, pembrolizumab i nivolumab, koji produljuju ukupno i preživljenje bez povratka bolesti. Njihova je dokazana učinkovitost ipak ograničena, posebice ako ih se koristi kao

monoterapiju, a ostale istraživane mogućnosti liječenja tek su u začecima, budući da je protutumorski imunosni odgovor u karcinomima glave i vrata izuzetno promjenjiv i vrlo uspješan u pronalaženju alternativnih načina odolijevanja imunosnom sustavu unatoč primijenjenoj terapiji. Detaljnije o trenutno postojećoj imunoterapiji za karcinome glave i vrata i problematici njihove upotrebe slijedi u narednom odjeljku.

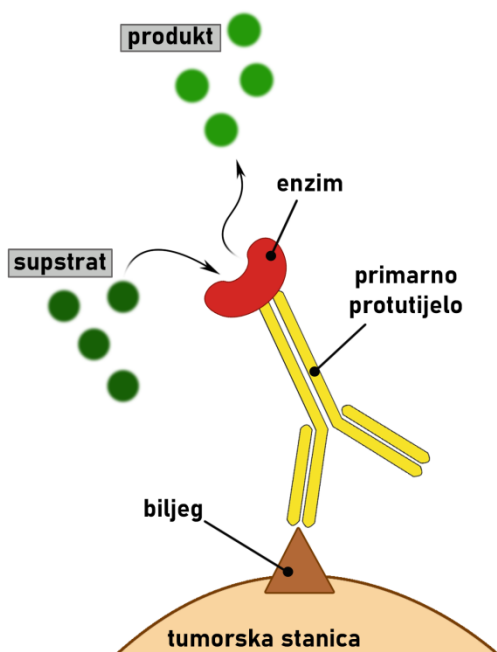
## 6. DIJAGNOSTICIRANJE TUMORA GLAVE I VRATA

Točna i precizna dijagnoza tumora glave i vrata iznimno je važna, budući da i sami tumori i njihovo liječenje mogu imati značajne posljedice na kvalitetu života pacijenata. Prvi je korak dijagnostičkog postupka patohistološko identificiranje tumora; ono je nužno s jedne strane zato što određeni klinički entiteti (poput sarkoidoze, tuberkuloze i sl.) mogu imitirati tumorske procese, a s druge strane zbog točne histološke klasifikacije tumora te utvrđivanja parametara koji služe kao osnova određivanja tumorskog stadija te nose određeni terapijski odnosno prognostički značaj.(69,70) Primjeri takvih parametara su veličina tumora (promjer i volumen), stupanj diferencijacije stanica, granice tumorskog tkiva, način rasta tumora (infiltrativan, ekspanzivan ili kombiniran), dubina invazije okolnih zdravih tkiva, perineuralna i limfovaskularna invazija, invazija kosti ili hrskavice, udaljenost tumorskog tkiva od resekcijskih rubova te prediktivni faktori odgovora na terapiju - prisutnost onkogenih virusa, PD-L1 status i tumorska opterećenost mutacijama (eng. *tumor mutational burden*, TMB).(70,71)

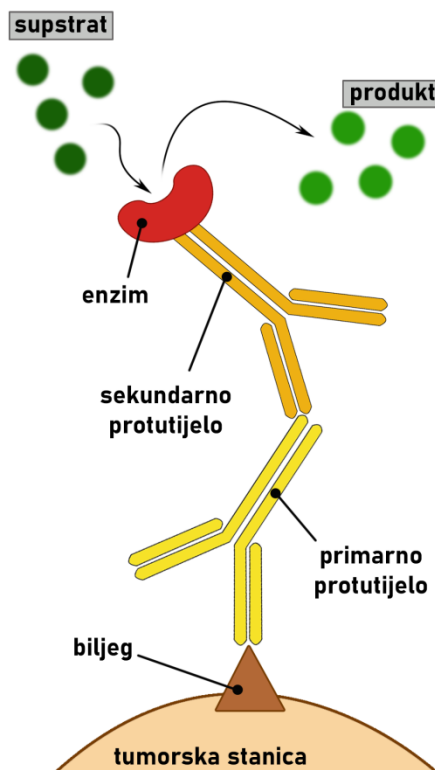
Metoda izbora za dijagnosticiranje tumora glave i vrata je imunohistokemijska analiza. Radi se o metodi detekcije proteina zasnovanoj na vezanju specifičnog protutijela na određeni proteinski antigen u tkivu. Vezana se protutijela, odnosno kompleks antigen-protutijelo, potom vizualiziraju uz pomoć enzima ili fluorescentnih signala (tzv. imunofluorescencija).(72) Glavne indikacije za primjenu imunohistokemije su definicija histogeneze, diferencijalna dijagnoza između reaktivnih i neoplastičnih stanja, etiološka dijagnoza zaraznih bolesti, određivanje prognostičkih čimbenika, određivanje meta ciljne terapije, lociranje primarnih tumora u malignoj bolesti, detekcija specifičnih proizvoda (kao što su hormoni i proteini) te utvrđivanje podvrsta tumora.(73) Slika 3 prikazuje način djelovanja imunohistokemijske metode.

Rutinski imunohistokemijski markeri korišteni za potvrdu dijagnoze tumora glave i vrata su anti-epitelni membranski antigen (eng. *anti-Epithelial Membrane Antigen*, EMA, p63, p40 te citokeratini (za karcinome pločastih stanica).(69) Osim navedenog, imunohistokemijska analiza vrlo je korisna u klasificiranju slabo diferenciranih odnosno nediferenciranih tumora neoznatog primarnog sijela, u slučaju da se takvi otkriju u limfnim čvorovima glave i vrata.(69,70) Radi što preciznijeg pregleda imunohistokemijskih obilježenih materijala koristi se tehnika digitalnog snimanja zvana *whole slide imaging* (WSI). Njome se uzorci vrlo detaljno prikazuju u digitalnom obliku na računalima, a uz nju se u analizi snimljenog mogu koristiti i programi umjetne inteligencije; navedeno uvelike olakšava analizu i umanjuje mogućnost pogreške.(74)

### DIREKTNA IMUNOHISTOKEMIJA



### INDIREKTNA IMUNOHISTOKEMIJA



Slika 3. Shematski prikaz imunohistokemijske metode.

Traženi se biljeg vizualizira vezanjem protutijela obilježenog enzimom, koji po vezanju pretvara bezbojni supstrat u obojeni produkt. Umjesto enzima, protutijela mogu biti obilježena fluorescentnim molekulama. U slučaju direktne imunohistokemije, sredstvo za vizualizaciju nosi samo protutijelo koje se veže za biljeg (primarno protutijelo), dok je kod indirektna imunohistokemije ono smješteno na sekundarnom protutijelu. Indirektnom se imunohistokemijom postiže amplifikacija signala, pa ova metoda ima prednost u slučaju slabe ekspresije traženih biljega.

U slučaju indikacije za imunoterapiju, na tumorskom se tkivu provode dodatne analize; konkretno, ispituje se prisutnost već spomenutih prediktivnih markera PD-L1 i humanog papiloma virusa te se određuje TMB. Tumori glave i vrata teže razvoju rezistencije na imunoterapiju, zbog čega ona u većini slučajeva ne bilježi značajan uspjeh, te važno procijeniti koliki bi on mogao biti kako bi se u konkretnog pacijenta primjena imunoterapije uopće odobrila. Navedena tri biljega služe upravo toj svrsi. O PD-L1 i HPV-statusu kao prediktivnim markerima bit će riječi u 9. poglavlju (REZISTENCIJA NA IMUNOTERAPIJU); iako se već uhodano koriste u kliničkoj praksi, korelacija njihove prisutnosti u tumorskom tkivu i terapijskog uspjeha pokazala se inkonzistentnom.(75,76) Ovdje će stoga naglasak biti stavljen na određivanje i značaj TMB-a kao novog i ekstenzivno istraživanog biljega u predviđanju odgovora na imunoterapiju.

TMB jest ukupan broj mutacija u kodirajućem dijelu tumorskog genoma, a izražava se kao broj mutacija po megabazi sekvencionirane DNK (mutacije/Mb). U teoriji, viši TMB zapravo znači povećanu ekspresiju tumorskih neoantigena, posljedično čemu se razvija intenzivniji imunosni odgovor i istovremeno raste podložnost imunoterapiji (iako konačni rezultat može biti i potpuno suprotan – vidi 9. poglavlje). TMB, dakle, indirektno predstavlja sliku cijelog imunosnog tumorskog mikrookoliša, i kao takav je puno kompleksniji i osjetljiviji marker od PD-L1 i HPV-statusa. Prethodna istraživanja pokazuju povoljniji terapijski odgovor i dulje preživljenje u slučaju tumora s visokim TMB-om (TMB-*high*, TMB-H) i podrazumijeva 10 ili više mutacija po megabazi.(75–77) Na osnovu toga, pembrolizumab je odobren za pacijente čiji su tumori TMB-H profila.(77)

## **7. INHIBITORI IMUNOSNIH KONTROLNIH TOČAKA U TERAPIJI TUMORA GLAVE I VRATA**

U terapiji tumora glave i vrata koriste se dva inhibitora imunosnih kontrolnih točaka: nivolumab i pembrolizumab. Oni su istovremeno i jedini oblici imunoterapije odobreni za korištenje u liječenju ovih tipova tumora. Oba lijeka su monoklonalna protutijela IgG4 tipa (pembrolizumab je humanizirano, a nivolumab potpuno humano protutijelo)(78) koja interagiraju s molekulom PD-1 izraženom prvenstveno na aktiviranim limfocitima T. Na taj način sprječavaju formiranje kompleksa PD-1 molekule i njeznog liganda PD-L1 izraženog na tumorskim stanicama, kao i posljedičnu anergiju ili smrt limfocita T. Uz navedeno, mijenjaju površinsku i unutarstaničnu ekspresiju molekula PD-1/PD-L1 signalnog puta.(16,79,80) Ovaj se mehanizam djelovanja naziva još i „otkočenjem“ imunosnog odgovora, s obzirom na to da uklanja supresiju izazvanu djeovanjem tumorskih i promijenjenih imunosnih stanica tumorskog mikrookoliša, odnosno spašava limfocite T od stanja iscrpljenosti i obnavlja njihovu imunosnu aktivnost.(60) Osim navedene interakcije ključne u protutumorskoj imunosti, do njoj sličnih može doći i između drugih stanica tumorskog mikrookoliša koje nose PD-1 molekulu odnosno njezine ligande; PD-1 izražen je i na limfocitima B i NK-stanicama, PD-L1 i na epitelnim, endotelnim i imunosnim stanicama, a PD-L2 na antigen-prezentirajućim stanicama (makrofagi, limfociti B, dendritičke stanice), stoga pembrolizumab i nivolumab potencijalno pospješuju protutumorski imunosni odgovor i na ovim razinama.

### **7.1. PD-1/PD-L1 signalni put – osnova za terapiju tumora glave i vrata**

Na molekularnoj razini, aktivnost PD-1/PD-L1 signalnog puta je inducibilna i vrlo strogo kontrolirana, budući da je on ključni regulator imunosne tolerancije i iscrpljenosti. Pri pokretanju imunosne reakcije, sve od navedenih molekula se ili tek pojavljuju ili se njihov izražaj povećava s vremenom i brojem stanica koje sudjeluju u imunosnom odgovoru. Tako su PD-1 molekule prisutne na površini naivnih limfocita tek na niskoj bazalnoj razini, dok se pri početnoj imunosnoj stimulaciji njihov broj povećava, te se pojavljuju i na makrofagima i dendritičkim stanicama. Stanice regulatornih limfocita T po svojoj prirodi imaju značajan broj PD-1 molekula na svojoj površini, međutim i njihov se broj povećava pri pokretanju imunosne reakcije. S druge strane, PD-1 ligandi nisu prisutni u većini normalnih tkiva; njihov se izražaj na površini imunosnih i drugih tkivnih stanica potiče primarno djelovanjem interferona gama



(IFN- $\gamma$ ). Sve navedeno služi kontroli opsega imunodne reakcije – kako se ona razbuktava, tako se pojavljuje i sve više koinhibitornih molekula koje osiguravaju da reakcija ne prijeđe okvire potrebne za eradikaciju patogena bez štete po zdravo tkivo. Prevelika se pak imunosupresija djelovanjem PD-1/PD-L1 sustava sprječava tako što on može polučiti svoj učinak samo u slučaju ukrižene reaktivnosti s limfocitnim antigenim receptorima (TCR to jest BCR), odnosno kada su ti receptori također vezani na antigen prezentiran na molekulu MHC kompleksa.(62,79)

Stanice tumora glave i vrata iskorištavaju PD-1/PD-L1 sustav tako što povećavaju izražaj PD-L1 molekula na površini malignih i imunodnih stanica – u usporedbi s normalnim limfocitima T, izražaj PD-L1 u tumorskom mikrookolišu povećan je u 46-100% pacijenata (ovisno o studiji).(62,81,82) Ovo se povećanje zbiva najčešće također pod utjecajem IFN- $\gamma$ , a u manjem broju slučajeva kao posljedica genetičkih promjena. Budući da su limfociti, specifično oni koji infiltriraju tumorsko tkivo (TILs), glavni izvor spomenutog citokina, može se zaključiti da je izražaj PD-L1 molekula na malignim stanicama kako obrambeni mehanizam za izmicanje imunodnom sustavu, tako i pokazatelj prisutnosti značajnog broja limfocita s protutumorskom aktivnošću te žustre borbe protiv malignih stanica.(62) Osim PD-1 liganada, i sama PD-1 molekula povećano je izražena u tumorskom mikrookolišu; bilježi se u čak 60% tumora glave i vrata, i kao takva predstavlja važan mehanizam imunodnog bijega.(56,82) Nadalje, kao što je navedeno u poglavlju „IMUNODNE CHECKPOINT MOLEKULE“/u 4. poglavlju, PD-1 ligandi mogu se vezati i na molekulu B7-1, pritom jednako tako izazivajući limfocitnu anergiju. [Ovaj mehanizam predstavlja moguće objašnjenje rezistencije na terapiju (vidi: 8. REZISTENCIJA NA TERAPIJU PD-1 INHIBITORIMA) PD-1 inhibitorima.](62,79) Sve navedeno većinski se odnosi na suprimiranje efektorske funkcije citotoksičnih limfocita T (CD8+), međutim PD-1/PD-L1 sustav može utjecati i na funkciju CD4+ limfocita T. Njegov izražaj na ovom tipu limfocita uzrokuje njihovu pretvorbu u regulatorne limfocite čiji velik broj u tumorskom tkivu vrlo djelotvorno potiskuje protutumorski imunodni odgovor.(56,79)

S obzirom na ključnu ulogu PD-1/PD-L1 signalnog puta u tumorigenezi karcinoma glave i vrata, opravdana je upotreba PD-1 inhibitora u njihovoj terapiji. Kao što je već rečeno, nivolumab i pembrolizumab djeluju poticajno na već postojeći imunodni odgovor, te zahvaljujući tome postižu velik terapijski uspjeh i uzrokuju manje štetnih posljedica na zdrava tkiva i organe u odnosu na konvencionalnu terapiju. Oba su lijeka odobrena za liječenje rekurentnih i metastatskih karcinoma glave i vrata kao monoterapija ili u kombinaciji s kemoterapijskim režimom. Slijedi pregled studija o učinkovitosti i sigurnosti PD-1 inhibitora, na osnovu kojih su i uvršteni u terapijske protokole.

## 7.2. Pembrolizumab

Pembrolizumab je prvi *checkpoint* inhibitor testiran i odobren za terapiju karcinoma glave i vrata. Studija koja je istraživala njegovu efikasnost u ovoj vrsti tumora i bila podloga njegovom odobrenju od strane Agencije za hranu i lijekove bila je KEYNOTE012, provedena od lipnja do listopada 2013. godine. Radilo se o multikohortnoj, multicentričnoj studiji faze 1b koja je istraživala sigurnost i antitumorsku aktivnost pembrolizumaba primijenjenog u pacijenata s dokazanim rekurentnim/metastatskim karcinomom glave i vrata s barem 1% izražaja PD-L1 molekule utvrđenog imunohistokemijski (njih 60), od čega ih je 23 imalo HPV-pozitivne karcinome, a ostatak HPV-negativne. Primarno se pratila pojava neželjenih događaja vezanih uz terapiju, te proporcija pacijenata kod kojih je postignut opći odgovor na lijek (potpuni ili djelomični). Sekundarno, pratio se opći odgovor na lijek u pacijenata s HPV-pozitivnim karcinomima te prethodno liječenih cetuksimabom i platinom, trajanje odgovora na terapiju (vrijeme od prvotnog odgovora na terapiju do progresije bolesti), preživljenje bez napretka bolesti (vrijeme od uključanja u studiju do zabilježene progresije bolesti ili smrti ispitanika) i opće preživljenje (vrijeme od uključanja u studiju do smrti).

Pembrolizumab se pokazao sigurnim i dobro podnošljivim; kod 38 od 60 ispitanika pojavili su se neželjeni događaji, prvenstveno manjih razmjera (prolazni umor, pruritus, osip), dok je 17% ispitanika razvilo teže posljedice uzimanja lijeka. 18% ispitanika postiglo je terapijski odgovor, češće u HPV-pozitivnih karcinoma. Opće preživljenje iznosilo je 13 mjeseci, trajanje odgovora na terapiju približno 12,2 mjeseca, a preživljenje bez progresije 2 mjeseca. Sve navedeno pokazalo je da se pembrolizumab dobro podnosi te posjeduje klinički značajno protutumorsko djelovanje u karcinomima glave i vrata. Na temelju ove studije odobren je u listopadu 2016. godine za korištenje u drugoj liniji liječenja rekurentnog/metastatskog karcinoma glave i vrata refrakternog na platinske režime.(83,84)

Ispitanici iz originalne KEYNOTE012 studije, u slučaju izostanka smrtnog ishoda, progresije bolesti, neprihvatljive toksičnosti ili odluke o povlačenju iz istraživanja, nastavili su s primanjem pembrolizumaba do završena 24 mjeseca liječenja; to je uključivalo i proširenu kohortu od 132 ispitanika, koji su primali nižu dozu lijeka u duljim intervalima (po uzoru na druge studije, koje su ukazivale na to da su niže doze i rjeđa primjena lijeka dostatne za klinički učinak). Medijan praćenja ispitanika iznosio je 9 mjeseci; šestero ih je dovršilo 2 godine primjene lijeka, a 18 ispitanika nastavilo je primati terapiju i nakon završetka ove etape praćenja. Neželjeni događaji vezani uz terapiju bili su prisutni u 64% pacijenata, ali velika većina njih bila je blaga i prolazna. Stopa odgovora bila je 18%, u 85% slučajeva terapijski je odgovor trajao dulje od 6 mjeseci (raspon od 2 do preko 30 mjeseci), a opće preživljenje nakon 12 mjeseci iznosilo je 38%. Ovo je dugotrajno praćenje potvrdilo prvotne rezultate o sigurnosti primjene pembrolizumaba i značajnu protutumorsku aktivnost dugog djelovanja (čak preko 30 mjeseci u

nekim slučajevima), čime se poduprlo korištenje ovog lijeka u rekurentnom/metastatskom karcinomu glave i vrata.(85)

Daljnja istraživanja usporedila su učinak pembrolizumaba kao monoterapije odnosno u kombinaciji s kemoterapijom te cetuksimaba u kombinaciji s kemoterapijom, u studiji nazvanoj KEYNOTE048. Pokazano je da pembrolizumab i sam i u kombiniranoj terapiji značajno nadmašuje cetuksimab po općem preživljenju (pritom je učinak bolji u slučaju većeg broja tumorskih stanica koje eksprimiraju PD-L1); nije bilo razlike u preživljenju bez progresije u usporedbi s primjenom cetuksimaba. Neželjeni događaji višeg stupnja (uključujući i smrt) bili su značajno rjeđi pri monoterapiji pembrolizumabom, a slični u grupama koje su primale pembrolizumab i kemoterapiju odnosno cetuksimab i kemoterapiju, što bi se moglo pripisati samoj kemoterapiji. S obzirom na pokazanu učinkovitost i sigurnost primjene, pembrolizumab sam ili u kombinaciji s kemoterapijom odobren je kao terapija prve linije za rekurentni/metastatski karcinom glave i vrata.(84,86) Uslijedilo je četverogodišnje praćenje u kojem je pembrolizumab +/- kemoterapija kontinuirano pokazivao poboljšanje ispitivanih parametara preživljenja u usporedbi s cetuksimab/kemoterapija protokolom.(87)

### 7.3. Nivolumab

FDA je odobrila nivolumab 2016. godine, nakon rezultata treće faze studije CheckMate 141. Radilo se o randomiziranoj studiji provedenoj od lipnja 2014. do kolovoza 2015. godine na 361 pacijentu s histološki potvrđenim rekurentnim (uključujući i metastatsku bolest) karcinomom glave i vrata unutar 6 mjeseci od posljednje doze sistemske terapije bazirane na platini (primarne ili adjuvantne) – dakle, s proširenom bolesti refrakternom na terapiju platinom. Pacijenti su primali nivolumab (240 pacijenata) odnosno standardnu monoterapiju (121 pacijent) po izboru ispitivača (metotreksat, docetaksel, cetuksimab). Preko 90% njih je prethodno primalo radioterapiju, a više od polovice jednu ili više linija sistemske terapije. Primarna analizirana varijabla bila je opće preživljenje (vrijeme od randomizacije do smrti od bilo kojeg uzroka), a sekundarne preživljenje bez progresije bolesti (vrijeme od randomizacije do datuma progresije bolesti ili smrti) te stopa odgovora. Osim navedenog, pratila se i sigurnost primjene nivolumaba, kvaliteta života ispitanika te povezanost između općeg preživljenja i razine PD-L1 odnosno HPV-statusa tumora.

Studija je pokazala statistički značajno veće opće preživljenje u grupi pacijenata koja je primala nivolumab u usporedbi sa standardnom terapijom (medijan 7,5 mjeseci naspram 5,1 mjeseci), te gotovo 20% veću procijenjenu jednogodišnju stopu preživljenja. Medijan preživljenja bez progresije bolesti nije se razlikovao među skupinama, ali procijenjena stopa preživljenja bez progresije 6 mjeseci nakon randomizacije bila je značajno viša uz nivolumab. Stopa odgovora iznosila je 13,3% u skupini koja je

primala nivolumab, a samo 5,8% uz standardnu terapiju. Osim toga, nivolumab je izazivao manje nuspojave i nepoželjnih učinaka te održavao kvalitetu života ispitanika stabilnom. Terapijski odgovor je bio nešto bolji u ispitanika s PD-L1-pozitivnim tumorima, HPV-pozitivnim tumorima ili oboje; iako ne značajno, budući da je kod ispitanika s tumorima negativnima na prisutnost PD-L1 odnosno HPV-a također zabilježen terapijski odgovor. S obzirom na rezultate studije, 2016. godine ovaj se novi lijek počeo koristiti kao druga linija liječenja karcinoma glave i vrata, rekurentnih/metastatskih nakon primjene režima baziranog na platini, odnosno bolesti koja ne odgovara na isti režim.(84,88)

11,4 mjeseca nakon primarne studije, analizirani su rezultati primjene nivolumaba u podgrupi pacijenata (njih 78) s lokalno proširenom bolesti refrakternom na upotrebu platine kao adjuvantne ili primarne terapije, koji su posljedično razvili rekurentnu ili metastatsku bolest. U ovom je slučaju nivolumab predstavljao prvu terapijsku liniju rekurentne/metastatske bolesti. I tu je nivolumab pokazao znatnu prednost u općem preživljenju i stopi odgovora na terapiju, s tim da su preživljenje bez progresije bolesti i stopa neželjenih posljedica terapije bili slični onima uz terapiju izbora ispitivača (metotreksat, docetaxel, cetuksimab).(89)

Rezultati praćenja ispitanika dvije godine poslije studije CheckMate 141 pokazuju stabilni učinak nivolumaba u usporedbi s terapijom izbora ispitivača; stope općeg preživljenja bile su 20,4% s nivolumabom naspram 3,8% s ostalom terapijom, dok su stopa preživljenja bez progresije i stopa odgovora na terapiju bile značajno više u skupini nivolumaba. Time se još jednom potvrdio terapijski uspjeh nivolumaba ne samo u rekurentnoj/metastatskoj bolesti refrakternoj na platinski režim, već i u prvoj liniji liječenja lokalno uznapredovale bolesti koja je uz terapiju platinom progredirala u rekurentnu/metastatsku.(90)

Kliničkim studijama i praktičnom primjenom pembrolizumaba i nivolumaba pokazan je njihov učinkovitost u terapiji karcinoma glave i vrata, međutim njemu su suprotstavljene nuspojave ovih lijekova specifične za imunoterapiju te ograničenost njihovog učinka ovisno o čimbenicima tumora i pacijenta, o čemu će biti riječi u sljedećim poglavljima.

## 8. NUSPOJAVE TERAPIJE PD-1 INHIBITORIMA

Nuspojave koje se vežu uz pembrolizumab i nivolumab mogu se ugrubo podijeliti u dvije skupine. Prvu skupinu čine opće nuspojave vezane uz intravensku primjenu lijekova, poput umora, slabosti, infuzijske reakcije i vrućice; one su prolazne i nemaju trajnih posljedica na zdravlje. Druga je skupina karakteristična za imunoterapeutike te se stoga nazivaju štetnim učincima uzrokovanim imunoterapijom (*immunotherapy related Adverse Effects*, irAEs); kao takve, ekstenzivno će se obraditi u ovom poglavlju. Riječ je o auto-inflamatornoj toksičnosti koja zahvaća specifične organe u tijelu, i posljedično se očituje simptomima vezanim za oštećenje njihovih funkcije ili strukture. Uglavnom se radi o organima s velikom dodirnom površinom s okolinom organizma (npr. koža, pluća, probavni trakt) odnosno onima s preegzistentnom ili tinjajućom autoimunosti (štitnjača, zglobovi). One mogu biti puno teže te dovesti do trajnih posljedica, pa čak i smrti.(91,92) Mehanizam nastanka ovih nuspojava nije točno poznat, ali postoji nekoliko predloženih hipoteza. Kao prvo, *checkpoint* blokada može potaknuti aktivnost limfocita T protiv zdravih tkiva koja su križno reaktivna s tumorskim stanicama, odnosno koja izražavaju PD-L1 molekulu radi zaštite vlastitog tkiva (npr. miociti i pituociti); drugim riječima, smanjuje autotoleranciju limfocita T. Osim toga, inhibitori kontrolnih točaka mogu povisiti razine postojećih autoantitijela.(93) Nuspojave se uobičajeno stupnjuju prema kriterijima toksičnosti američkog Nacionalnog instituta za rak (Nacional Cancer Institute's Common Toxicity Criteria, NCI-CTC) u pet razreda vidljivih u Tablici 1.(94)

**Tablica 1. Stupnjevanje štetnih učinaka imunoterapije prema kriterijima NCI-CTC.**

Stupanj toksičnosti	Toksični učinak
0	nema toksičnog učinka
1	blagi toksični učinak
2	umjereni toksični učinak
3	teški toksični učinak
4	životno ugrožavajući toksični učinak
5	smrt

Pri primjeni PD-1 inhibitora irAEs se javljaju u 70-75% slučajeva (71,8% za nivolumab, 75,1% za pembrolizumab); one teže (trećeg ili višeg stupnja) zabilježene su u 14,1% slučajeva za nivolumab odnosno 19,8% za pembrolizumab, a smrtne posljedice terapije bile su prisutne u 0,36% slučajeva (najčešće uslijed miozitisa, miokarditisa i pneumonitisa). Pembrolizumab obično izaziva pneumonitis, artralgijske i hepatitis, a nivolumab endokrinopatije.(95) Neželjeni se učinci javljaju većinski unutar prva tri mjeseca(92) od početka terapije; obično su prvo primjetne kožne promjene, ukoliko ih ima, potom gastrointestinalna patologija, hepatotoksičnost i endokrinopstije, pneumonitis, i relativno kasno u liječenju nefritis.(91) Njihovo je trajanje različito; prevalentne su akutne nuspojave koje nastaju za vrijeme trajanja liječenja i razriješe se samostalno ili uz pomoć simptomatske terapije brzo po prestanku primjene PD-1 inhibitora, ali mogu potrajati i dulje od 12 tjedana nakon prekida terapije te se tada smatraju kroničnima. Pretpostavlja se da kronične nuspojave nastaju uslijed ireverzibilnog oštećenja stanica zbog čega je nemoguće u potpunosti oporaviti fiziološku funkciju organa, odnosno zbog pokretanja subakutne ili kronične upalne reakcije djelovanjem PD-1 inhibitora. Osim toga, postoji i mogućnost odgođenih neželjenih posljedica, koje se prvi put javljaju godinu dana nakon prestanka terapije.(92)

Općenito postupanje s pacijentima s obzirom na rizik od i pojavu neželjenih događaja sastoji se od sljedećih postupaka:

### **1. Određivanje sklonosti za razvoj potencijalnih neželjenih učinaka vezanih uz imunoterapiju**

Prije početka liječenja, potrebno je uzeti detaljnu anamnezu (uključno s postojećim ili u obitelji prisutnim autoimunskim bolestima te prethodnom terapijom *checkpoint* inhibitorima), utvrditi opće fizičko stanje i izraditi osnovne laboratorijske (kompletna krvna slika, koagulogram, osnovna biokemija, hepatogram, albumini, LDH, lipaza, kreatin-kinaza, CRP; razine hormona; urin test-trakica; EKG, BNP, troponin; virološke pretrage – HIV, HBV, HCV) i slikovne pretrage (rendgenogram srca i pluća).(91,96)

### **2. Praćenje pacijenta tijekom primjene imunoterapije**

Periodične kontrole nužne su kako bi se na vrijeme otkrile bilo kakve posljedice imunoterapije u nastajanju. Pri svakom ciklusu, potrebno je ponoviti kompletnu krvnu sliku, koagulogram, osnovnu biokemiju, hepatogram, LDH, kreatin-kinazu, lipazu i CRP. Svaka dva do tri mjeseca ponavljaju se pretrage razine hormona štitnjače, urin test-trakica, parametri srčane funkcije (EKG, BNP, troponin) te rendgenogram srca i pluća, a nakon završetka terapije i na sljedećim kontrolama gore navedene osnovne krvne pretrage, razina hormona štitnjače, srčana funkcija te pretrage urina.(91)

### **3. Dijagnosticiranje irAE**

Pri otkrivanju nuspojave uzrokovane imunoterapijom na kontrolnim pregledima ili po prijavi pacijenta, potrebno je pronađenu nuspojavu stupnjevati prema NCI-CTC kriterijima, isključiti sve moguće diferencijalne dijagnoze te eventualne postojeće infekcije (za kasnije potrebe simptomatske terapije).(97)

### **4. Zbrinjavanje irAE**

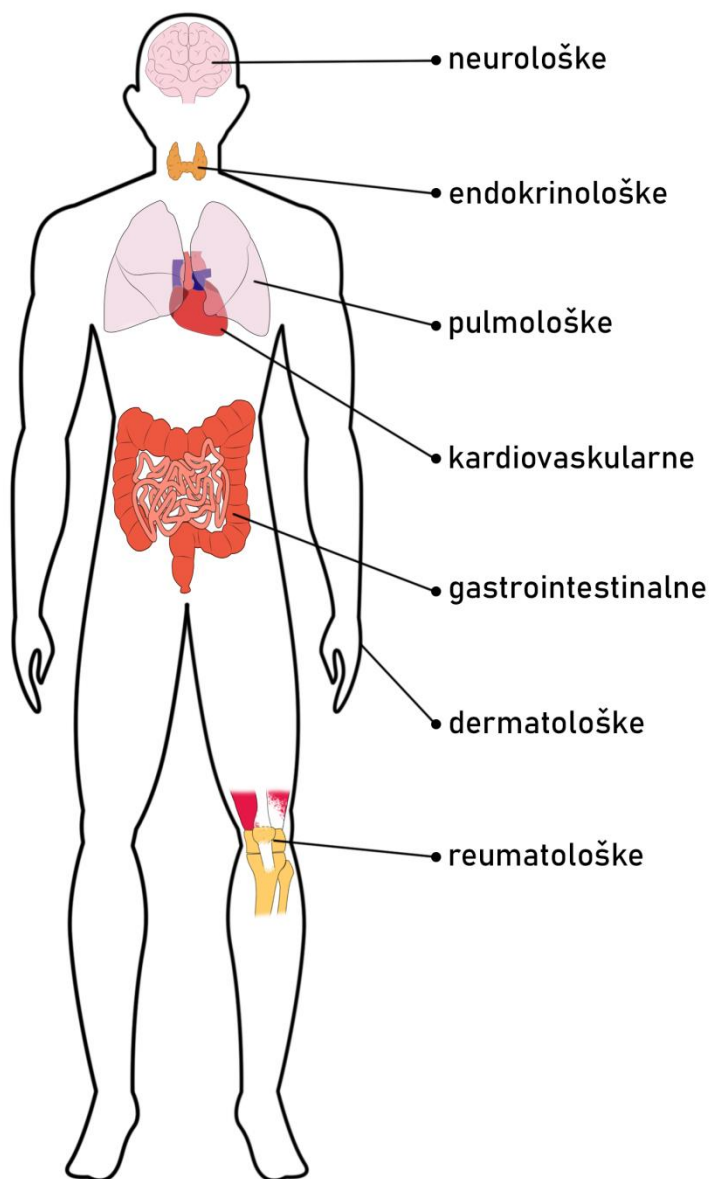
Neželjene posljedice prvog stupnja ne zahtjevaju posebnu simptomatsku terapiju, a primjena imunoterapije može se nastaviti. Za nuspojave drugog do četvrtog stupnja potrebna je primjena imunosupresivne terapije, prvenstveno kortikosteroida, uz eventualni prekid primjene imunoterapije. Za drugi se stupanj simptomatska terapija ne primjenjuje u svim slučajevima, već samo za kolitis, pneumonitis, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, neurološke nuspojave i hipofizitis. Za treći i četvrti stupanj obavezna je primjena sistemskih kortikosteroida te pauziranje ili prekidanje imunoterapije. U slučaju perzistentnih ili ponavljanih nuspojava, imunoterapija se obično prekida i uvode se kortikosteroidi, a u slučaju četvrtog stupnja čak i druga imunosupresivna terapija (u Hrvatskoj infliksimab i vedolizumab) . Sami kortikosteroidi ne interferiraju s liječenjem maligne bolesti, te se obično daju u dozi od 0,5 do 2 mg/kg dnevno kroz dva do tri tjedna, nakon čega se tijekom 4-6 tjedana doza smanjuje do prekida primjene. Istovremeno je potrebno pacijentima dati profilaksu za infekciju *Pneumocystisom*, a starijim pacijentima i za reaktivaciju VZV.(91,96,97)

U sljedećim odlomcima navode se najčešći neželjeni događaji (irAEs) pri primjeni PD-1 inhibitora te njihovo zbrinjavanje.(91,93,97) Prikaz općih nuspojava i irAEs nalazi se na Slici 4.

## Opće nuspojave

- umor
- slabost
- glavobolja
- vrućica
- infuzijska reakcija

## irAEs



Slika 4. Nuspojave imunoterapije PD-1 inhibitorima



### 8.1. Endokrinološke nuspojave

Endokrinološke nuspojave javljaju se u 15-20% slučajeva liječenja PD-1 inhibitorima (posebno često uz nivolumab), i imaju vrlo visoku tendenciju prelaska u kronična stanja. Većina ih se otkrije slučajno, u asimptomatskih pacijenata tijekom screeninga. Specifičnost zahvaćanja ovog organskog sustava jest da ono ne zahtjeva imunosupresivnu terapiju kortikosteroidima, već se zbrinjava samo hormonskim nadomjesnim liječenjem ukoliko je potrebno. Najčešća endokrinopatija je hipotiroidizam (10%), čiji je medijan nastanka 6 tjedana po početku terapije, a prethodi mu destruktivni tiroiditis s prolaznom i uglavnom subkliničkom tireotoksikozom. Rijetko spontano prolazi, tako da je pacijentu potrebna hormonska nadomjesna terapija. Pri pretragama je bitno obratiti pozornost na konfiguraciju tiroidnog stimulacijskog hormona i tiroksina; u slučaju niskih razina oba hormona, opravdana je sumnja na hipopituitarizam, te se preporuča provjeriti jutarnju razinu kortizola u krvi ne bi li se izbjegao razvoj adrenalne krize.

Hipofizitis odnosno disfunkcija hipofize je gotovo jedinstvena posljedica terapije *checkpoint* inhibitorima. Vrlo je rijedak kod monoterapije PD-1 inhibitorima (<1%, medijan pojave 26 tjedana). Obično se prezentira simptomima pituitarne upale (glavoboljom, mučninom, diplopijom) i/ili simptomima vezanima uz panhipopituitarizam, prvenstveno uz adrenalnu insuficijenciju (mučnina, slabost, hipotenzija, poliurija, gubitak apetita); klinčka je slika nespecifična i ponekad teško povezuje s pravim uzrokom. Simptomi upale zbrinjavaju se udarnom dozom kortikosteroida i najčešće su prolazni, ali hipopituitarizam je uglavnom trajan, te pacijent mora primiti hormonsku nadomjesnu terapiju (prednizon ili hidrokortizon).

Neželjeni događaj gotovo ekskluzivan za terapiju PD-1 inhibitorima jest pojava dijabetesa melitusa. Razvija se u <1% pacijenata, ali ga je važno imati na umu jer prva prezentacija može biti u obliku dijabetičke ketoacidoze. Razinu glukoze u krvi potrebno je pratiti na početku i prije svakog ciklusa terapije; ukoliko ona povišena, ciklus se može odgoditi te provesti naknadno po normalizaciji nalaza. Pacijenti obično zahtjevaju doživotnu terapiju inzulinom.

### 8.2. Gastrointestinalne nuspojave

Gastrointestinalne nuspojave generalno su rjeđe kod primjene PD-1 inhibitora u usporedbi s CTLA4-inhibitorima; kolitis se javlja u 5% slučajeva te se uglavnom prezentira proljevastim stolicama, a nešto rjeđe bolovima u trbuhu i hematohezijom. Ove su nuspojave najčešće samo akutnog trajanja i dobro odgovaraju na kortikosteroidnu terapiju; proljev refrakteran na imunosupresive potrebno je iznova klinički procijeniti i isključiti drugu pozadinsku patologiju (npr. infekciju, imunoterapijom uzrokovanu celijakiju), a moguć je i kasan nastup proljeva koji je uglavnom posljedica insuficijencije pankreasa, tj.

steatoreja (1% pojavnosti). Akutni kolitis drugog ili višeg stupnja također zahtjeva obradu kako bi se isključile akutne infekcije, latentne infekcije prije primjene imunosupresiva, jetrene i bolesti gušterače te upalne bolesti crijeva (uključivo sa slikovnim i endoskopskim pretragama).

Hepatitis se javlja u 3-10% slučajeva, nešto rjeđe uz terapiju PD-1 nego CTLA-4 inhibitorima; uglavnom se radi o asimptomatskoj prolaznoj leziji ili blagim nespecifičnim simptomima (slabost, mialgije, rjeđe žutica) bez prelaska u kronično stanje. Pri obradi hepatitisa višeg stupnja težine važno je provjeriti jetrenu sintetsku funkciju te isključiti infektivni hepatitis; u slučaju refrakternosti na kortikosteroide ne preporučuje se primjena infliksimaba zbog njegove hepatotoksičnosti, premda postoje studije čiji rezultati pokazuju da infliksimab u ograničenim dozama razrješuje simptome imunoterapijom uzrokovanog hepatitisa bez dodatne štete po jetru. Umjesto njega može se primijeniti i mikofenolat mofetil.

### 8.3. Dermatološke nuspojave

Kožne nuspojave jedne su od najčešćih nuspojava terapije checkpoint inhibitorima, te se uglavnom manifestiraju dermatitisima, pruritusom ili vitiligom (koji se daleko najčešće pojavljuje u pacijenata s melanomima, dakle uglavnom pri primjeni CTLA-4 inhibitora). Dermatitis i pruritus uglavnom se dobro kontroliraju topikalnim (eventualno sistemskim) steroidima odnosno GABA-ergičkim agonistima (u slučaju pruritusa bez osipa), međutim ove su nuspojave unatoč svojoj bezopasnosti i rijetkom potrebom za prekidom imunoterapije iznimno problematične za pacijente i smanjuju kvalitetu života. Kožne manifestacije rijetko mogu biti i teške te životno opasne, poput toksične epidermalne nekrolize i Steven-Johnsonovog sindroma.

### 8.4. Reumatološka toksičnost

Manifestacije reumatološke toksičnosti uključuju artralgiu, mialgiu i artritis, često udružene u sindrome koji sliče reumatoidnom artritisu te polimiozitisu, a javlja se i imunoterapijom uzrokovan *sicca*-sindrom sličan Sjögrenovom sindromu, s tim da su pacijenti obično seronegativni i bez prisutnog HLA-B27 genotipa. U zbrinjavanju ovih stanja koriste se nesteroidni protuupalni lijekovi u slučaju blažih tegoba, a ukoliko poboljšanja nema prelazi se na peroralne kortikosteroide (npr. prednizon), premda je odgovor na steroide često suboptimalan te čak dvije trećine pacijenata zahtjeva primjenu DMARDova (*disease-modifying antirheumatic drugs*). Reumatske tegobe uglavnom traju dulje vremena tijekom primjene imunoterapije te minimalno 6-12 mjeseci poslije njezinog prekida, a u većini slučajeva prelaze u trajne zdravstvene tegobe. Slično kao i kožne nuspojave, predstavljaju značajan problem za pacijente jer vrlo

negativno utječu na kvalitetu života, a pritom obično nisu dovoljno teške ni opasne da bi se prekinula imunoterapija i uvelo visokodozno imunosupresivno liječenje, zbog čega se u zbrinjavanju ovakvih pacijenata uglavnom balansira između kontinuirane protutumorske imunosupresivne terapije i lijekova poput nesteroidnih protuupalnih lijekova, DMARDova i niskih doza steroida ne bi li se doskočilo nuspojavama.

### **8.5. Neurološke nuspojave**

Neurološke nuspojave rijetka su pojava pri terapiji PD-1 inhibitorima, te uključuju mijasteniju gravis, Guillan-Barréov sindrom, centralnu i/ili perifernu neuropatiju, aseptički meningitis, encefalitis, transverzalni mijelitis, neurosarkoidozu, vaskularnu encefalopatiju i druga stanja. Trajanje i težina svakog pojedinog neželjenog događaja iz ovog širokog spektra uvelike se razlikuju. Meningoencefalitis se uspješno tretira kortikosteroidima te obično prolazi brzo i bez trajnih posljedica (iako rijetko može biti fatalan); mijastenija gravis povezana s imunoterapijom ima tendenciju prelaska u kronični sindrom, ali se kao takva dobro kontrolira lijekovima; Guillan- Barréov sindrom je visoko fatalan, a čak i pacijenti koji se oporave s imunosupresivnom terapijom često pate od zaostale slabosti ili gubitka osjeta; periferna (većinom senzorna) neuropatija je pak nuspojava uz koju se najčešće razvija kronicitet.

### **8.6. Kardiovaskularna toksičnost**

Kardiovaskularna toksičnost javlja se u 1-2% pacijenata te obuhvaća upalu i oštećenje u srčanožilnom sustavu na svim razinama: krvožilju (najčešće temporalni arteritis i polymialgia rheumatica, a uz to i bolest koronarnih žila te hipertenzija), miokardu (miokarditis, Takotsubo kardiomiopatija, zatajenje srca i kardiogeni šok), perikardu (perikarditis i perikardijalni izljev) te provodnom sustavu srca (razne aritmije). U kronična stanja često prelaze perikarditis i hipertenzija, a miokarditisi kao trajnu posljedicu mogu imati rezidualnu kardiomiopatiju. Neželjeni događaji terapije PD-1 inhibitorima s kardijalnim manifestacijama su najčešći uzroci smrti povezani s imunoterapijom, zbog čega se pri prvoj pojavi sumnje na srčanu patologiju pacijente hospitalizira, provodi puni opseg pretraga za provjeru srčane funkcije i strukturalnog integriteta, a imunoterapija se trajno obustavlja već na drugom stupnju tegoba, što kod nuspojava na drugim organskim sustavima nije slučaj.

## 8.7. Pulmološke nuspojave

Neželjeni događaji koji zahvaćaju respiratorni sustav vrlo su važan uzrok morbiditeta i mortaliteta pri terapiji PD-1 inhibitorima, posebno pembrolizumabom. Najčešće stanje pritom je pneumonitis koji se manifestira suhim kašljem, smanjenom saturacijom krvi kisikom i na rendgenogramu vidljivih bilateralnim infiltratima poput mutnog stakla; prvi je stupanj pneumonitisa asimptomatski uz pozitivan radiološki nalaz. Pneumonitis u većini slučajeva dobro reagira na kortikosteroidnu i/ili imunomodulatornu terapiju, uz mogućnost zaostanka infiltrata na slikovnim pretragama koji se također obično spontano razriješe nakon godinu-dvije. Osim pneumonitisa, javljaju se i suhi kašalj i *wheezing* bez radioloških znakova upale (terapija inhalacijama i poboljšanje do razrješenja za 6-12 mjeseci) te sarkoidoza (prolazi spontano, odnosno uspješno se liječi kortikosteroidima), a moguća je i reaktivacija plućne tuberkuloze, s tim da uloga PD-1 inhibitora u reaktivaciji još nije definitivno potvrđena. U obradi pacijenata s dispnejom važno je isključiti i srčanu, jetrenu i bubrežnu bolest te plućne infekcije (preferabilno mikrobiološkom analizom bronhoskopskih uzoraka te bronhoalveolarnog lavata).

Zaključno, neželjeni učinci terapije PD-1 inhibitorima česta su pojava, prvenstveno oni nižeg stupnja težine i dobrog odgovora na simptomatsku terapiju, no postoji i značajan broj teških (pa čak i smrtnih) posljedica imunoterapije, zbog čega je pacijente koji ju primaju potrebno pomno pregledati prije njezinog početka radi procjene općeg stanja i identifikacije potencijalnih rizičnih čimbenika, a potom redovito pratiti tijekom razdoblja primjene PD-1 inhibitora kako bi se mogući razvoj nuspojava što ranije otkrio i zbrinuo. Važno je napomenuti i da naizgled blage nuspojave mogu znatno oštetiti pacijentovu kvalitetu života, što također treba uzeti u obzir pri zbrinjavanju i nastojati tome doskočiti. Također, pokazano je da kombiniranje PD-1 inhibitora s drugim *checkpoint*-inhibitorima (prvenstveno ipiliumabom) i kemoterapijom značajno povisuje rizik od pojave neželjenih događaja, kao i njihovu težinu; s obzirom na to, poželjno je okrenuti se monoterapiji PD-1 inhibitorima kad god je to moguće, a stanje pacijenata koji primaju kombiniranu terapiju potrebno je češće i pažljivije kontrolirati.

## 9. REZISTENCIJA NA IMUNOTERAPIJU PD-1 INHIBITORIMA

Unatoč dokazanoj učinkovitosti PD-1 inhibitora u terapiji pojedinih tipova tumora te dugom terapijskom učinku, pokazalo se da su oni ograničeni na samo mali broj pacijenata – u 60-70% njih nema zabilježenog objektivnog odgovora, a u 20-30% onih koji isprva odgovore na terapiju tumor se nakon nekog vremena proširi ili ponovno javi nakon izlječenja.(60) Do navedenog dolazi zbog rezistencije na imunoterapiju, koja može biti primarna odnosno intrinzična (nema odgovora od početka primanja terapije zbog tumorskih faktora koji povećavaju rezistenciju na imunosno uklanjanje, a time i imunoterapiju) ili sekundarna odnosno adaptivna (nestanak učinka nakon odrednog razdoblja djelovanja terapije uslijed specifičnih upalnih signala koji nastaju pri imunosnoj reakciji na tumor).(60,98) Rezistencija na imunoterapiju blisko je povezana s funkcioniranjem i aktivnošću imunosnog sustava pacijenta te imunih svojstava samog tumora. Slijedi kratki pregled mehanizama rezistencije na terapiju PD-1 inhibitorima.

### 9.1. Tumorski neoantigeni

Tumorski neoantigeni su antigeni izraženi na tumorskim stanicama kao posljedica njihovih genetskih mutacija; pokazano je da tumori s većom količinom neoantigena bilježe višu razinu citotoksične aktivnosti od strane CD8+ tumor-infiltrirajućih limfocita, koja je pak povezana s povećanim preživljenjem kod tumora glave i vrata. S obzirom na inicijalno izraženiji protutumorski odgovor u tumorima s velikim brojem neoantigena, kod njih se bilježi i bolji odgovor na imunoterapiju.(98) Ova povezanost ipak nije jednoznačna budući da se neoantigeni razlikuju po svojoj kvaliteti (odnosno imunogenosti), pa će dva tumora sličnog neoantigenog tereta ali njihove različite kvalitete različito odgovoriti na imunoterapiju.(98) Dakle, jedan od mehanizama primarne rezistencije na tumor bio bi tumoru intrinzična smanjena ekspresija neoantigena putem MHC-I sustava i/ili njihova smanjena imunogenost.

Do smanjenja ekspresije neoantigena može doći i tijekom primjene imunoterapije; tumori glave i vrata specifični su po učestalim i mnogobrojnim mutacijama pod utjecajem selekcijskog pritiska (u ovom slučaju imunoterapije)(60), koje s jedne strane potencijalno vode do stvaranja novih neoantigena, no s druge strane mogu rezultirati stečenom inhibicijom prezentacije neoantigena. Uglavnom se radi o mutacijama interferonskih signalnih puteva i ekspresije molekula MHC-I te TAP-1/2 (*transporter associated with antigen processing complex 1 and 2*).(98)

## 9.2. Tumorsko mutacijsko opterećenje (eng. *tumor mutational burden, TMB*)

Gore spomenuta sklonost mutacijama u stanicama tumora glave i vrata sama je po sebi čimbenik intrinzične rezistencije na terapiju PD-1 inhibitorima, nevezano za učinak na brojnost i prezentaciju neoantigena. Naime, velika količina nasumičnih mutacija u tumoru vodi do stvaranja više različitih staničnih populacija (odnosno subklonova) unutar istog tumora s različitom imunogenosti, što se naziva tumorskom heterogenošću. Na neke od njih će imunoterapija djelovati, dok na druge (one nisko imunogene) neće; što je više različitih klonova u tumoru, raste vjerojatnost da na neke od njih terapija neće imati učinka. Tumorska je heterogenost čest mehanizam u pozadini pojave inicijalnog dobrog protutumorskog djelovanja primijenjenog lijeka te kasnijeg relapsa bolesti, i veže se uz smanjeno preživljenje kod tumora glave i vrata.(82,98)

Tumorsko opterećenje mutacijama (*tumor mutational burden, TMB*) može, s druge strane, rezultirati i mutacijama koje čine tumor susceptibilnijim imunoterapiji, posebice ukoliko inteferiraju sa signalnim putem IFN- $\gamma$ ;(14,60,99) tumorski odgovor, dakle, ovisi o ravnoteži između mutacija koje podržavaju protutumorski imunski odgovor i onih koje ga ometaju.

## 9.3. Tumorski mikrookoliš

Imunski profil tumorskog mikrookoliša i perifernih tkiva također igra ulogu u tumorskoj rezistenciji na imunoterapiju. Pokazano je da je prisutnost protumorigenih imunskih stanica poput TAM-ova (*tumor-associated macrophages*, makrofagi M2 fenotipa) i MDSC-ova (*myeloid-derived suppressor cells*), koje su važan izvor imunosupresivnih citokina poput TGF- $\beta$  i IL-10, povezana s razinom terapijskog odgovora; njihova je prisutnost u tumorskom mikrookolišu prije primjene imunoterapije stoga potencijalni prediktor njezine uspješnosti. Što je ovih imunosupresivnih stanica više, očekuje se slabiji odgovor i manja uspješnost liječenja.(82,98,99) Osim imunosupresivnih stanica, za uspješnost terapijskog odgovora izuzetno je važan i postojeći protutumorski imunski odgovor, prvenstveno onaj tumor-infiltrirajućih limfocita. (TILs) Naime, pokazano je da najveću uspješnost terapije inhibitorima kontrolnih točaka biježe tzv. „vrući“ odnosno „upaljeni“ tumori (eng. *hot tumors, inflamed tumors*), nazvani tako zbog obilnog limfocitnog infiltrata i visoke razine ekspresije gena karakterističnih za dendritičke stanice i CD8+ limfocite. S obzirom na to da u tumoru već postoji aktivna borba protiv malignih stanica, PD-1 inhibitori mogu efikasno potaknuti istu i tako postići dobre terapijske rezultate. Za razliku od toga, *cold* odnosno *non-inflamed* tumori nemaju osnove za povoljan odgovor na primjenu PD-1 inhibitorima, te se u skladu s time najčešće pokazuju rezistentnima na terapiju.(14,99,100)

Ostale karakteristike tumorskog mikrookoliša povezane s terapijskim odgovorom su izražaj PD-L1 molekula i HPV-status.

Kao što je već prije spomenuto, povišena ekspresija PD-L1 molekula u tumorskom mikrookolišu mehanizam je tumorske obrane od imunosnog odgovora, međutim ona nam indirektno pokazuje da je taj isti imunosni odgovor vrlo aktivan (s obzirom na to da je glavni induktor ekspresije PD-L1 u tumorima limfocitni i NK-stanični IFN- $\gamma$ ) te da u tumorskom tkivu postoje brojne mete za PD-1 inhibitore.(60,99) PD-L1 negativni tumori (oni s manje od 1-5% stanica koje izražavaju PD-L1, ovisno o studiji) imaju slab ili nikakav odgovor na primjenu PD-1 inhibitora.(98,99,101)

HPV-pozitivni tumori prijemčiviji su za terapiju inhibitorima kontrolnih točaka iz dva razloga: na svojoj površini izražavaju viralne antigene, što ih čini značajno imunogenima i prepoznatljivima imunosnom sustavu koji se protiv njih vrlo aktivno bori, a osim toga obično imaju i visoku ekspresiju PD-1/PD-L1 molekula u tumorskom mikrookolišu i bogat limfocitni tumorski infiltrat.(14,99) Među karcinomima glave i vrata, HPV-pozitivni su najčešće karcinomi usne šupljine i orofarinksa;(68) ostalim lokacijama ova karakteristika uglavnom nedostaje, te bi zbog toga odgovor na imunoterapiju mogao biti nešto slabiji.

#### 9.4. Karakteristike pacijenata

Karakteristike samih pacijenata još su jedna od varijabli koje utječu na rezistenciju; među njima vrijedi spomenuti pušački status, stanje mikrobiote probavila i spol.

Prema rezultatima meta-analize Botticellija i suradnika, pušači bilježe bolji terapijski odgovor budući da su sastojci duhanskog dima potentni DNA-mutageni, što vodi do povećanog tumorskog opterećenja mutacijama i potencijalne veće imunogenosti barem nekih tumorskih staničnih linija.(102)

Mikrobiota probavila regulira generalno funkcioniranje imunosnog sustava, pa tako i njegovu aktivnost pri primjeni PD-1 inhibitora. Pokazano je da terapijski odgovor ovisi o konkretnim mikroorganizmima prisutnima u probavilu – neke bakterije ga potenciraju, a druge ometaju – te o primjeni antibiotika tijekom primanja imunoterapije (pacijenti koji su liječeni antibioticima imali su smanjeno opće preživljenje i preživljenje bez progresije bolesti).(60,101,103)

Spolne razlike u odgovoru na PD-1 inhibitore manje su nego što je slučaj s CTLA4-inhibitorima, te su rezultati brojnih studija i sistemskih pregleda ponešto kontradiktorne. U većini slučajeva, ipak, čini se da žene bilježe nešto manje uspješan odgovor na terapiju nivolumabom i pembrolizumabom od muškaraca; njihov je imunosni odgovor na patogene predominantno humoralni i Th2 tipa (za razliku od muškaraca,

kod kojih prevaguju citotoksični CD8+ mehanizmi), a tumori koji se u njih razvijaju su obično slabije imunogeni i „skriveniji“ od imunskog sustava, što su mogući mehanizmi primarne rezistencije na terapiju PD-1 inhibitorima.(16,93,102)

### 9.5. Predviđanje odgovora na terapiju PD-1 inhibitorima

U prethodnim odlomcima bilo je riječi o generalnim odrednicama odgovora na terapiju PD-1 inhibitorima. S obzirom na spoznaju o mogućnosti postojanja rezistencije, prije primjene *checkpoint* inhibitora potrebno je odrediti faktore povezane s njezinom prisutnošću u konkretnom tumoru. U kliničkoj se praksi najčešće koriste ekspresija molekule PD-L1 i HPV-status(99) te nekolicina rjeđih, eksperimentalnih parametara.

Ekspresija molekule PD-L1 može se izraziti pomoću dvije vrijednosti: CPS i TPS. CPS odnosno *Combined Positive Score* jest omjer svih stanica koji izražavaju PD-L1 te ukupnog broja vijabilnih tumorskih stanica.(104) Radi se o neizravnom imunoenzimskom testu (imunohistokemijskoj analizi) pomoću kojeg se stanice koje ekspiriraju PD-L1 obojaju i mogu se razlikovati od ostatka tkiva bez PD-L1 molekule na svojoj površini; potom se pod svjetlosnim mikroskopom u polju s najmanje 100 vijabilnih tumorskih stanica broje obojene odnosno vijabilne tumorske stanice, te se ta dva broja podijele. Obojene stanice mogu biti tumorske, koje obavezno moraju imati djelomično ili potpuno linearnu obojenu membranu da bi ušle u račun, te limfociti i makrofagi, za koje je dovoljna i samo obojena citoplazma.(105) Tumor Proportion Score jest vrijednost koja izražava postotak vijabilnih tumorskih stanica koje pokazuju djelomičnu ili potpunu obojanost bilo kojeg intenziteta, što govori o prisutnosti PD-L1 na njihovoj površini. TPS veći ili jednak 50% označava visoku ekspresiju PD-L1. Metoda dobivanja ove vrijednosti slična je onoj za CPS – također se radi o neizravnom imunoenzimskom testu kojim se oboja stanična membrana tumorskih stanica s prisutnom molekulom PD-L1.(106) Generalno gledano, CPS>1 odnosno TPS>50% smatraju se prediktorima dobrog terapijskog odgovora te se terapija PD-1 inhibitorima odobrava u pacijenata s ovakvim tumorskim fenotipom. Određivanje razine PD-L1 u tumorskom tkivu ušla je u kliničku praksu te je obavezna prije propisivanja terapije PD-1 inhibitorima.

Važno je napomenuti da vrijednosti CPS<1 odnosno TPS<50% ne znače nužno i slabiji odgovor na imunoterapiju. Njihova ograničenost u predikciji terapijskog odgovora leži u više razloga. Kao prvo, tumori glave i vrata vrlo su heterogeno tkivo u kojem se stanice jako međusobno razlikuju po postojećim mutacijama; budući da se za izvođenje ovog testa koristi samo mali dio tumora, ne može se sa sigurnošću reći da rezultat vrijedi za cijeli maligni proces. Jednako se tako razlikuju i primarni tumor, metastaze u regionalnim limfnim čvorovima i udaljene metastaze; ako jedno od njih bilježi povoljan terapijski



odgovor, ne mora biti tako i za ostale. Nadalje, uslijed visoke tumorske opterećenosti mutacijama (*tumor mutational burden*, TMB) jedno te isto tumorsko sijelo može u različitim dijelovima tumora bilježiti različitu razinu molekule PD-L1, te se pozitivni CPS ili TPS rezultat dobiven prije terapije može promijeniti u njezinom tijeku. Također, treba uzeti u obzir terapijske modalitete primijenjene prije imunoterapije – radioterapija i kemoterapija mogu znatno izmijeniti spektar mutacija i molekularne ekspresije u tumorskom tkivu, što zbog vlastite mutagenosti što zbog uništavanja tumorskih stanica koje su ekspimirale PD-L1. Naposljetku, provođenje imunohistokemijskih testova radi utvrđivanja CPS i TPS vrlo je nestandardizirano. Na tržištu postoji više kitova za izvedbu ovih testova koji daju različite rezultate te nema standardizacije po pitanju vremena uzimanja uzorka, lokacije s koje se uzorak uzima (primarni, nodalni ili metastatski tumor) ni dijela/količine tumora koju je potrebno uzorkovati. Uslijed svega navedenog, i pacijenti s negativnim imunohistokemijskim testovima mogu imati koristi od imunoterapije.(107)

HPV-status određuje se imunohistokemijskim testovima za detekciju p16 u tumorskom tkivu, odnosno izravnim dokazivanjem virusne DNK ili RNK in-situ hibridizacijom te PCR-om.(68) Rutinsko dokazivanje prisutnosti virusa u tumorskom tkivu indicirano je za novootkrivene tumore orofarinksa.(108)

p16 surogatni je marker za zarazu HPV-om; njegova povećana ekspresija može biti uzrokovana aktivnošću virusnih proteina E6 i E7. Međutim, isti učinak na razinu p16 mogu imati i procesi nepovezani s HPV-om uzrokovanim tumorom, poput upala, regenerativnih procesa i mutacija p53 – zbog toga osjetljivost i specifičnost ovog markera variraju između 80 i 90%, i on nije nužno povezan s prisutnošću transkripcijski aktivnog HPV-a koji bi uzrokovao bolest, odnosno postoji grupa pacijenata čiji se tumori opisuju s p16+/HPV-.(109) Ipak, ovaj je marker široko prihvaćen u kliničkoj upotrebi jer su brojne studije pokazale statistički značajno bolju prognozu p16-pozitivnih orofaringealnih karcinoma, bez obzira na aktivnost virusa, a osim toga imunohistokemijski test kojim se on dokazuje je povoljan i lako dostupan.(108) Prema nekim istraživanjima, pacijenti s p16+/HPV- tumorima ipak nemaju značajno bolju prognozu od onih s HPV-negativnim tumorima(109), što dovodi u pitanje prognostičku vrijednost p16, i u takvim slučajevima smjernice predlažu provođenje HPV-specifičnih testova kojima se izravno dokazuje prisutnost i aktivnost virusa u tumoru.(108)

## 10. IMUNOTERAPIJA TUMORA GLAVE I VRATA U HRVATSKOJ

U Republici Hrvatskoj se za terapiju karcinoma glave i vrata također koriste PD-1 inhibitori, pembrolizumab i nivolumab.

### 10.1. Pembrolizumab

Pembrolizumab je u hrvatskom dostupan pod tvorničkim imenom KEYTRUDA, u obliku koncentrata otopine za infuziju (25 mg lijeka/ml otopine). Kao monoterapija ili u kombinaciji s kemoterapijom koja sadrži platinu i 5-fluorouracil (EXTREME protokol) indiciran je za prvu liniju liječenja metastatskog ili neresektabilnog rekurentnog karcinoma skvamoznih stanica glave i vrata u odraslih bolesnika čiji tumori ekspimiraju PD-L1 s CPS-om većim ili jednakim 1.(110)

Osim toga, registriran je i za liječenje rekurentnog ili metastatskog karcinoma koji ekspimiraju PD-L1 uz TPS veći ili jednak 50%.(110)

Obično se prima u dozi od 200 mg svaka 3 tjedna, ili 400 mg svakih 6 tjedana, intravenskom infuzijom u trajanju od 30 minuta, za odrasle bolesnike; doza za pedijatrijsku populaciju je 2mg/kg tjelesne težine (do najviše 200 mg) svaka 3 tjedna .(110)

### 10.2. Nivolumab

Nivolumab (tvorničkog imena OPDIVO) prisutan je na tržištu također u obliku koncentrata otopine za infuziju, različitih doza (10 mg lijeka/ml otopine, u bočicama od 4, 10 i 25 ml koncentrata). Indiciran je za liječenje rekurentnog ili metastatskog planocelularnog raka glave i vrata u odraslih bolesnika u kojih je došlo do progresije bolesti tijekom ili nakon terapije platinom.(111) Prima se u dozi od 240 mg svaka 2 tjedna tijekom 30 minuta.

Nivolumab i pembrolizumab nalaze se na HZZO-ovoj Osnovnoj listi lijekova (objavljenoj 27.04.2023.), ali pripadaju i Popisu posebno skupih lijekova. Prema HALMED-ovom Zbirnom popisu objavljene cijene lijekova iz 2022. godine, cijena 10mg/ml koncentrata lijeka OPDIVO u bočici od 4 ml iznosi 497,22 €, a ona 25 mg/ml koncentrata lijeka KEYTRUDA u bočici od 4 ml iznosi 3.010,57 €.(112)

## 11. KOMBINIRANO LIJEČENJE IMUNOTERAPIJOM I DRUGIM TERAPIJSKIM MODALITETIMA

Imunoterapija u određenoj populaciji pacijenata bilježi visoku uspješnost i sigurnost primjene, međutim broj pacijenata koji potpuno i dugotrajno odgovore terapiju još uvijek je malen, a pojavnost neželjenih događaja raste s povišenjem doze imunoterapeutika. Iz tog razloga pokušava se imunoterapiju uvesti u kombinirano liječenje, odnosno primijeniti ju uz druge terapijske modalitete radi postizanja još boljih rezultata; neke od ovih kombinacija već su ušle u kliničku primjenu.

Generalno gledano, PD-1 inhibitori mogu se kombinirati s kirurškim liječenjem, kemoterapijom, radioterapijom i drugim imunoterapeuticima.

### 11.1. Kombinacija s kirurškim liječenjem

Kirurško je liječenje često osnova terapije primarnih tumora glave i vrata, posebice u usnoj šupljini. Imunoterapija svoje mjesto uz kiruršku može naći u adjuvantnom ili neoadjuvantnom obliku. U slučaju primjene poslije kirurškog zahvata, analogno klasičnim kemoterapeuticima, disrupcija tumorskog tkiva operacijom i otkrivanje novih antigena potencijalno bi rezultirala pojačanim imunim odgovorom koji bi PD-1 inhibitori dodatno potaknuli.<sup>(113)</sup> Osim toga, njihova bi veća specifičnost mogla rezultirati većim uspjehom u uništavanju preostalih tumorskih stanica, a s druge strane izazivaju puno manje nuspojave od citotoksičnih lijekova te bi se mogla koristiti kod pacijenata koji ne mogu podnijeti toksične učinke kemoterapije.<sup>(56)</sup>

S druge strane, neoadjuvantna primjena PD-1 ima još i više potencijalnih koristi. Najprije, smanjenje tumorske mase prije operacije omogućuje njenu manju ekstenzivnost, čime se poboljšavaju funkcionalni i estetski rezultati kirurškog zahvata, kao i psihološke posljedice po pacijente i njihova kvaliteta života. Zatim, preoperativno poticanje protutumorskog imunog odgovora može pomoći u uklanjanju nakon operacije preostalih tumorskih stanica, te time smanjiti incidenciju rekurencije i metastaziranja. Naposljetku, izlaganje dotad neliječenih tumora monoterapiji imunom aktivnim lijekovima ili njihovom kombinacijom omogućilo bi praćenje biomarkera za odgovor na terapiju; biopsije i reseksijski materijal mogli bi se analizirati na promjene u tumorskom mikrookolišu radi utvrđivanja molekularnih i staničnih učinaka imunoterapije.<sup>(56)</sup>

Provedena su brojna istraživanja uspjeha neoadjuvantne terapije pembrolizumabom odnosno nivolumabom u tumorima glave i vrata. Jedno od prvih takvih je istraživanje Uppalurija i suradnika

(2020.) koje je pokazalo sigurnost neoadjuvantne primjene jedne doze pembrolizumaba u resektabilnim tumorima stadija III i IV, te 44%-tnu regresiju tumora gledano u svih pacijenata, a čak preko 55% u njih 22%.(113–115) Horton i suradnici (2021.) istraživali su sigurnost i učinak neoadjuvantne primjene nivolumaba; pokazao se sigurnim za primjenu, uz niski broj teških neželjenih događaja, a patološki se odgovor javio u trećine pacijenata. U istih je zabilježena i klinička regresija tumora te povoljan odgovor na kiruršku terapiju.(114,116) Preliminarni rezultati studije CheckMate-358 prezentirani su na konferenciji Europskog društva za medicinsku onkologiju (*European Society for Medical Oncology*, ESMO) 2017. godine, a u cijelosti su objavljeni 2021. godine. Pokazano je da je neoadjuvantna primjena nivolumaba sigurna u pacijenata s resektabilnim HPV+/HPV- karcinomima glave i vrata stadija III-IV; zabilježen je patološki odgovor u 23,5% HPV+ i 5,9% HPV- tumora, regresija tumora zabilježena je u značajnog broja pacijenata (više u onih s HPV+ tumorima), a u više od polovice pacijenata nije bilo relapsa dvije godine poslije provedene terapije.(113,114,117) Rezultati studije Wise-Draper i suradnika (2022.) su 52%-tni patološki utvrđen odgovor tumora (*pathologic tumor response*, pTR; udio resekciranog tumorskog materijala s nekrozom tumora, keratinoznim ostacima i divovskim stanicama/histocitima) na neoadjuvantni pembrolizumab, na temelju čega je za 41% tumora snižen stadij. U pacijenata koji su pokazali odgovor na pembrolizumab nije bilo progresije ni povratka bolesti.(113,114,118)

S obzirom na sve navedeno, čini se da PD-1 inhibitori imaju budućnost u neoadjuvantnoj primjeni pri liječenju tumora glave i vrata.

## 11.2. Kombinacija s kemoterapijom

Kemoterapija, uz toksični efekt uslijed interferencije s tumorskom DNA odnosno proteinima potrebnih za stanično umnažanje, ima i određene imunološke učinke koji igraju ulogu u protutumorskom imunom odgovoru. Pri samom uništavanju stanica, oslobađaju se tumorski antigeni i DAMP-ovi koji potiču reakciju imunskih stanica; za PD-1 inhibitore i njihovo djelovanje je možda najvažnije osnaživanje aktivnosti efektorskih limfocita T smanjenjem izražaja koinhibitorskih molekula (prvenstveno PD-L1), regrutiranje novih limfocita T u tumorsko tkivo i diferencijacija tumor-specifičnih citotoksičnih limfocita T.(119,120)

Standard terapije rekurentnih/metastatskih karcinoma glave i vrata jest kombinacija kemoterapije bazirana na platini (najčešće cisplatin), 5-fluorouracila i ciljanog lijeka cetuksimaba; najpoznatija studija koja proučava učinak zajedničke primjene ovog standardnog režima i PD-1 inhibitora jest KEYNOTE-048,(56) ažurirana u srpnju 2022. godine. Ova studija uspoređuje ishode pacijenata s

rekurentnim/metastatskim karcinomima glave i vrata liječenih pembrolizumabom kao monoterapijom, kombinacijom pembrolizumaba i kemoterapije te kombinacijom cetuksimaba i kemoterapije. Pokazano je da pembrolizumab i njegova kombinacija s kemoterapijom imaju međusobno sličan i povoljniji učinak na preživljenje u odnosu na kombinaciju cetuksimaba i kemoterapije; produljuju opće preživljenje i preživljenje bez progresije bolesti, pokazuju poboljšanu stopu odgovora na terapiju te povisuju plato preživljenja odnosno broj konačno preživjelih pacijenata nakon primanja terapije (koji je za pembrolizumab+kemoterapiju čak nešto viši nego uz sam pembrolizumab).(87)

Međutim, važno je primijetiti da se uz kombinaciju imunoterapije i kemoterapije veže i izuzetno velik broj neželjenih događaja, što ograničava njezinu upotrebu. Naime, podaci iz literature pokazuju da incidencija s liječenjem povezanih neželjenih posljedica kod ovog kombiniranog terapijskog modaliteta seže čak o 97,7%, što je najviše u usporedbi sa svim drugim kombinacijskim terapijama za tumore odnosno imunoterapijom kao jednim modalitetom liječenja. Pritom je incidencija teških (trećeg ili višeg stupnja) neželjenih događaja čak 68,3%.(120) Slično je pokazano i u KEYNOTE-048: kombinacija pembrolizumaba i kemoterapije bila je povezana s čak 96,9% neželjenih događaja, a od toga 71,7% teških, što je i nešto više od onih prisutnih uz liječenje cetuksimabom i kemoterapijom.(87)

Zajednička primjena imunoterapije i kemoterapije pokazuje, dakle, zavidne rezultate po pitanju progresije bolesti i preživljenja pacijenata s tumorima glave i vrata, no pritom je sigurnosni profil podosta nepoželjan, te postoji potreba za razvojem novih, razumnijih kombinacija s manje neželjenih događaja i višim terapijskim uspjehom.

### **11.3. Kombinacija s radioterapijom**

Terapija zračenjem u kombinaciji sa sustavnom terapijom primarna je nekirurška definitivna opcija liječenja lokalno uznapredovalog karcinoma skvamoznih stanica glave i vrata, te još jedan modalitet liječenja koji u pozadini svog toksičnog djelovanja sadrži i imunološke mehanizme, vidljive u akutnoj upali, nekrozi i fibrozi koje se javljaju nakon ozračivanja.(121) Jedno od zanimljivih svojstava radioterapije je tzv. apskopalni učinak (eng. *abscopal effect*) – sposobnost djelovanja na mjesta u tijelu udaljena od ozračenog.(119,121) Budući da se isti učinak eksperimentalno nije uspio postići u pokusnih životinja s manjkom limfocita T ili konkretno manjkom CD8+ limfocita T, smatra se da je mehanizam ovog djelovanja u svojoj suštini imunosni. Nadalje, slično kemoterapiji, zračenje također ima citotoksičan efekt na tumorske stanice, pri čemu se oslobađaju različiti imunogeni spojevi što pobuđuju antitumorske učinke imunosnih stanica. Također, radioterapija može u tumorski mikrookoliš regrutirati antitumorske limfocite T zahvaljujući regulaciji adhezijskih molekula.(119)

S druge strane, akutno djelovanje zračenja na imunološki sustav može biti i suprimirajuće. Ono regrutira i MDSCs te regulatorne limfocite T u tumorski mikrookoliš, inducira djelovanje TAM-ova što često rezultira lokalnim relapsom tumora, a reaktivni kisikovi spojevi koji se otpuštaju pri djelovanju radioterapije intenziviraju aktivaciju TGF- $\beta$ , jedan od glavnih imunosupresivnih citokina.(119) Uz to, naravno, kolateralna žrtva zračenja je i određen broj imunskih stanica; primijenjeno na mjesto primarnog tumora te na regionalne limfne čvorove s ciljem uništavanja tamošnjih metastaza, inhibirat će regrutiranje T-stanica i njihov *priming*, odnosno uništiti efektorske T-stanice unutar imunološkog mikrookruženja tumora.(113)

Zbog navedenih imunosupresivnih učinaka, određeni broj studija (JAVELIN H&N 100, KEYNOTE-412, GORTEC-REACH) koje su se provodile radi istraživanja terapijske strategije nazvane „imunokemoradioterapijom“ (primjena adjuvantnog zračenja i klasične kemoterapije uz dodatak imunoterapije) nisu uspjele pokazati koristan učinak po preživljenje pacijenata, a prema rezultatima GORTEC-REACH čak se favorizira standardna kemoradioterapija. Pretpostavljeno je da je tome tako iz dva razloga: kao prvo, jer se u svim navedenim istraživanjima imunoterapija primjenjivala konkurentno s ostalim terapijskim modalitetima, te je pritom izražen imunosupresivni učinak zračenja onemogućio djelovanje imunoterapije; kao drugo, jer se u svima primjenjivalo i elektivno zračenje limfnih čvorova. Dvije studije koje su pokazale pozitivne rezultate kombinacije imunoterapije i radioterapije, studije PACIFIC (karcinom pluća) i Checkmate 577 (ezofagealni karcinom) nisu uključivale elektivno zračenje limfnih čvorova, a imunoterapija je primijenjena nakon dovršenja kemoradioterapije; moguće je da je vrijeme oporavka imunskog sustava prije primjene *checkpoint* inhibitora rezultiralo povoljnijim ishodima.(113)

S obzirom na gore navedeno, a i na generalne antitumorske imunosne učinke radioterapije koji bi se mogli potencirati imunoterapijom, od njihove se potencijalno korisne kombinacije ne odustaje, već novija istraživanja mijenjaju svoj pristup i smjer – ispituje se učinkovitost imunoterapije primijenjene sekvencijski uz kemoradioterapiju, te terapija u pacijenata s povoljnijom prognozom (HPV-pozitivni tumori).

Nedavna studija faze II randomizirala je 80 bolesnika s lokalno uznapredovalim karcinomom glave i vrata koji su primali definitivni CRT s istodobnim ili sekvencijalnim liječenjem pembrolizumabom; i preživljenje bez progresije bolesti i preživljenje nakon jedne odnosno dvije godine poslije terapije bili su viši u skupine pacijenata koja je primala sekvencijalni pembrolizumab.(113,122) Studija EA3161 koja se trenutno provodi također istražuje adjuvantnu primjenu nivolumaba nakon kemoradioterapije.(113,121,123)

Pacijenti s HPV-pozitivnim tumorima glave i vrata generalno imaju bolju prognozu, povezanu s biomarkerom PD-L1 (čija je ekspresija u njih povećana) i izražajem virusnih antigena koji im jamče veću imunogenost. S obzirom na to, u ovih se pacijenata nastoji de-eskalirati protutumorsko liječenje na način da se umjesto kemoradioterapije primijeni definitivno liječenje radioterapijom i adjuvantnom imunoterapijom. Studija KEYCHAIN uspoređuje standardnu kemoradioterapiju i kombinaciju radioterapije i pembrolizumaba(113,121,124), a studija NRG HN006 kemoradioterapiju (zlatni standard terapije), kemoradioterapiju deeskalirane doze te kombinaciju radioterapije deeskalirane doze i nivolumaba.(113,121,125)

## ZAHVALE

Zahvaljujem se svom mentoru, dr. Marinu Prpiću, na pomoći i savjetima u izradi ovog diplomskog rada, a posebno na strpljivosti i velikoj slobodi izražaja koju sam imala pri pisanju.

Veliko hvala cijeloj mojoj obitelji i prijateljima na neslomljivoj podršci tijekom studija; njihova vjera u mene nije posustala čak ni kad moja vlastita jest. Posebno hvala mojoj majci Biljani, koja vrlo dobro zna kako je to prolaziti kroz medicinski fakultet, i čiji me bistri um vodio kroz svaku sumnju i prepreku.

Hvala mojim legićima i Ivi; ponedjeljci s njima bili su osvježenje i polet prijeko potrebni za hvatanje u koštac s tjednim obavezama. Nadam se da sam vam bila na ponos!

I naposljetku, hvala Viktoru, kojemu dugujem ljepotu i šarolikost kako ovog diplomskog rada, tako i cijele ove godine.



## LITERATURA

1. Cohen N, Fedewa S, Chen AY. Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am*. 2018 Nov;30(4):381–95.
2. Lydiatt WM, Patel SG, O’Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual: Head and Neck Cancers-Major 8th Edition Changes. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):122–37.
3. Gormley M, Creaney G, Schache A, Ingarfield K, Conway DI. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. *Br Dent J*. 2022 Nov 11;233(9):780–6.
4. Head and Neck Cancers - NCI [Internet]. 2021 [cited 2023 Apr 5]. Available from: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>
5. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primer*. 2020 Nov 26;6(1):92.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
7. Šekerija M, Bubanović L, Lončar J, Čukelj P, Veltruski J, Mikolaj L, et al. Registar za rak Republike Hrvatske - Incidencija raka u Hrvatskoj 2020. *Hrvat Zavod Za Javno Zdr*. 2020;(45):37.
8. Winn D, Lee YC, Hashibe M, Boffetta P, the INHANCE consortium. The INHANCE consortium: toward a better understanding of the causes and mechanisms of head and neck cancer. *Oral Dis*. 2015 Sep;21(6):685–93.
9. Hashim D, Genden E, Posner M, Hashibe M, Boffetta P. Head and neck cancer prevention: from primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Ann Oncol*. 2019 May;30(5):744–56.
10. Thompson-Harvey A, Yetukuri M, Hansen AR, Simpson MC, Adjei Boakye E, Varvares MA, et al. Rising incidence of late-stage head and neck cancer in the United States. *Cancer*. 2020 Mar;126(5):1090–101.
11. Chow LQM. Head and Neck Cancer. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2020 Jan 2;382(1):60–72.

12. Goy J, Hall SF, Feldman-Stewart D, Groome PA. Diagnostic delay and disease stage in head and neck cancer: A systematic review. *The Laryngoscope*. 2009 May;119(5):889–98.
13. Brouha XDR, Tromp DM, Hordijk GJ, Winnubst JAM, de Leeuw JRJ. Oral and pharyngeal cancer: Analysis of patient delay at different tumor stages. *Head Neck*. 2005 Nov;27(11):939–45.
14. Magnes T, Wagner S, Kiem D, Weiss L, Rinnerthaler G, Greil R, et al. Prognostic and Predictive Factors in Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2021 May 7;22(9):4981.
15. Abbas, Abul K., Lichtman AH, Pillai S. *Stanična i molekularna imunologija*, 8. izdanje. 8th ed. MEDICINSKA NAKLADA, Zagreb; 2018. 530 p.
16. Amiji MM, Milane LS. *Cancer Immunology and Immunotherapy* [Internet]. 1st ed. Academic Press; 2021. 548 p. (Delivery Strategies and Engineering Technologies in Cancer Immunotherapy; vol. 1). Available from: <https://doi.org/10.1016/C2020-0-00370-1>
17. Naing A, Hajjar J, editors. *Immunotherapy* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [cited 2023 Apr 24]. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1244). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-41008-7>
18. Burtneß B, Golemis EA, editors. *Molecular Determinants of Head and Neck Cancer* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cited 2023 Apr 24]. (Current Cancer Research). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-78762-6>
19. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther*. 2021 May;221:107753.
20. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*. 2020 Aug;30(16):R921–5.
21. Feng Y, Ye Z, Song F, He Y, Liu J. The Role of TAMs in Tumor Microenvironment and New Research Progress. Muddassir Ali M, editor. *Stem Cells Int*. 2022 Aug 15;2022:1–11.
22. Boutilier AJ, ElSawa SF. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 29;22(13):6995.
23. Yan M, Zheng M, Niu R, Yang X, Tian S, Fan L, et al. Roles of tumor-associated neutrophils in tumor metastasis and its clinical applications. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Aug 17;10:938289.
24. Masucci MT, Minopoli M, Carriero MV. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front Oncol*. 2019 Nov 15;9:1146.

25. Koyama S, Nishikawa H. Mechanisms of regulatory T cell infiltration in tumors: implications for innovative immune precision therapies. *J Immunother Cancer*. 2021 Jul;9(7):e002591.
26. Li C, Jiang P, Wei S, Xu X, Wang J. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Mol Cancer*. 2020 Dec;19(1):116.
27. Plitas G, Rudensky AY. *Regulatory T Cells in Cancer*. 2020;
28. Scott EN, Gocher AM, Workman CJ, Vignali DAA. Regulatory T Cells: Barriers of Immune Infiltration Into the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2021 Jun 10;12:702726.
29. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*. 2016 Mar;37(3):208–20.
30. Veglia F, Sanseviero E, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol*. 2021 Aug;21(8):485–98.
31. Yang Y, Li C, Liu T, Dai X, Bazhin AV. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumors: From Mechanisms to Antigen Specificity and Microenvironmental Regulation. *Front Immunol*. 2020 Jul 22;11:1371.
32. Zhang Z, Liu S, Zhang B, Qiao L, Zhang Y, Zhang Y. T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Feb 11;8:17.
33. DeVito NC, Plebanek MP, Theivanthiran B, Hanks BA. Role of Tumor-Mediated Dendritic Cell Tolerization in Immune Evasion. *Front Immunol*. 2019 Dec 10;10:2876.
34. Fu C, Jiang A. Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2018 Dec 20;9:3059.
35. Liu Q, Zhang C, Sun A, Zheng Y, Wang L, Cao X. Tumor-Educated CD11b<sup>high</sup>low Regulatory Dendritic Cells Suppress T Cell Response through Arginase I. *J Immunol*. 2009 May 15;182(10):6207–16.
36. Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol*. 2019 May;16(5):430–41.
37. Seliger B, Koehl U. Underlying mechanisms of evasion from NK cells as rationale for improvement of NK cell-based immunotherapies. *Front Immunol*. 2022 Aug 12;13:910595.

38. Gun SY, Lee SWL, Sieow JL, Wong SC. Targeting immune cells for cancer therapy. *Redox Biol.* 2019 Jul;25:101174.
39. Johnston SL. Biologic therapies: what and when? *J Clin Pathol.* 2007 Jan 1;60(1):8–17.
40. Schilling G, Arnold D. Grundlagen der Immuntherapie. *Radiol.* 2020 Aug;60(8):682–6.
41. Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2019 Mar;18(3):175–96.
42. Immunotherapy for Cancer - NCI [Internet]. 2015 [cited 2023 Apr 27]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy>
43. Taefehshokr N, Baradaran B, Baghbanzadeh A, Taefehshokr S. Promising approaches in cancer immunotherapy. *Immunobiology.* 2020 Mar;225(2):151875.
44. Watson S. WebMD. [cited 2023 Apr 27]. Types of Immunotherapy. Available from: <https://www.webmd.com/cancer/immunotherapy-treatment-types>
45. Kumar AR, Devan AR, Nair B, Vinod BS, Nath LR. Harnessing the immune system against cancer: current immunotherapy approaches and therapeutic targets. *Mol Biol Rep.* 2021 Dec;48(12):8075–95.
46. Pardoll D. Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. *Semin Oncol.* 2015 Aug;42(4):523–38.
47. Fu Z, Li S, Han S, Shi C, Zhang Y. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Mar 22;7(1):93.
48. Hafeez U, Parakh S, Gan HK, Scott AM. Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules.* 2020 Oct 16;25(20):4764.
49. Ordóñez-Reyes C, Garcia-Robledo JE, Chamorro DF, Mosquera A, Sussmann L, Ruiz-Patiño A, et al. Bispecific Antibodies in Cancer Immunotherapy: A Novel Response to an Old Question. *Pharmaceutics.* 2022 Jun 11;14(6):1243.
50. Wu Y, Yi M, Zhu S, Wang H, Wu K. Recent advances and challenges of bispecific antibodies in solid tumors. *Exp Hematol Oncol.* 2021 Dec 18;10(1):56.
51. Butterfield LH. Cancer vaccines. *The BMJ.* 2015 Apr 22;350:h988.

52. Liu J, Fu M, Wang M, Wan D, Wei Y, Wei X. Cancer vaccines as promising immunotherapeutics: platforms and current progress. *J Hematol Oncol*. 2022 Mar 18;15(1):28.
53. Han J, Gu X, Li Y, Wu Q. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. *Biomed Pharmacother*. 2020 Sep;129:110393.
54. He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res*. 2020 Aug;30(8):660–9.
55. Sukari A, Nagasaka M, Al-Hadidi A, Lum LG. Cancer Immunology and Immunotherapy. *Anticancer Res*. 2016 Nov 1;36(11):5593–606.
56. Horton JD, Knochelmann HM, Day TA, Paulos CM, Neskey DM. Immune Evasion by Head and Neck Cancer: Foundations for Combination Therapy. *Trends Cancer*. 2019 Apr;5(4):208–32.
57. Nirschl CJ, Drake CG. Molecular Pathways: Coexpression of Immune Checkpoint Molecules: Signaling Pathways and Implications for Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2013 Sep 15;19(18):4917–24.
58. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016 Feb;39(1):98–106.
59. Schwartz RH. T Cell Anergy. *Annu Rev Immunol*. 2003 Apr;21(1):305–34.
60. Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2021 Jan 24;16(1):223–49.
61. Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, et al. Defining ‘T cell exhaustion’. *Nat Rev Immunol*. 2019 Nov;19(11):665–74.
62. Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer*. 2021;12(9):2735–46.
63. Robert C. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat Commun*. 2020 Jul 30;11(1):3801.
64. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2019 Dec 17;10:2965.

65. A Brief History of Checkpoint Inhibitors [Internet]. Cancer Today. [cited 2023 May 28]. Available from: <https://www.cancertodaymag.org/fall2020/a-brief-history-of-checkpoint-inhibitors/>
66. WhatisBiotechnology.org [Internet]. [cited 2023 May 28]. Immune checkpoint inhibitors are key cancer treatment tool. Available from: <https://www.whatisbiotechnology.org/>
67. Xavier FCA, Silva JC, Rodini CO, Rodrigues MFSD. Mechanisms of immune evasion by head and neck cancer stem cells. *Front Oral Health*. 2022 Aug 2;3:957310.
68. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol*. 2018 Oct;52:228–40.
69. López F, Mäkitie A, De Bree R, Franchi A, De Graaf P, Hernández-Prera JC, et al. Qualitative and Quantitative Diagnosis in Head and Neck Cancer. *Diagnostics*. 2021 Aug 24;11(9):1526.
70. Helliwell TR, Giles TE. Pathological aspects of the assessment of head and neck cancers: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol*. 2016 May;130(S2):S59–65.
71. Božena Šarčević. Specifics of histopathological analysis of head and neck cancer. *Libri Oncol*. 2016;44(2–3):31–5.
72. Hussaini HM, Seo B, Rich AM. Immunohistochemistry and Immunofluorescence. *Methods Mol Biol*. 2023;(2588):439–50.
73. Caly DDN, Viana A, Rapoport A, Dedivitis RA, Curioni OA, Cernea CR, et al. Indications and pitfalls of immunohistochemistry in head and neck cancer. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013 Jan;79(1):75–81.
74. Kumar N, Gupta R, Gupta S. Whole Slide Imaging (WSI) in Pathology: Current Perspectives and Future Directions. *J Digit Imaging*. 2020 Aug;33(4):1034–40.
75. Burcher KM, Lantz JW, Gavrilă E, Abreu A, Burcher JT, Fauchoux AT, et al. Relationship between Tumor Mutational Burden, PD-L1, Patient Characteristics, and Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*. 2021 Nov 16;13(22):5733.
76. Peng YP, Wang R, Liu QD, Xu XW, Wei W, Huang XT, et al. Combination of Tumor Mutational Burden and Specific Gene Mutations Stratifies Outcome to Immunotherapy Across Recurrent and Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Genet*. 2021 Nov 16;12:756506.

77. Haddad RI, Seiwert TY, Chow LQM, Gupta S, Weiss J, Gluck I, et al. Influence of tumor mutational burden, inflammatory gene expression profile, and PD-L1 expression on response to pembrolizumab in head and neck squamous cell carcinoma. *J Immunother Cancer*. 2022 Feb;10(2):e003026.
78. Ai L, Chen J, Yan H, He Q, Luo P, Xu Z, et al. Research Status and Outlook of PD-1/PD-L1 Inhibitors for Cancer Therapy. *Drug Des Devel Ther*. 2020 Sep;Volume 14:3625–49.
79. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol*. 2017 Aug 23;8:561.
80. Tang Q, Chen Y, Li X, Long S, Shi Y, Yu Y, et al. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. *Front Immunol*. 2022 Sep 13;13:964442.
81. Kirtane K, St. John M, Fuentes-Bayne H, Patel SP, Mardiros A, Xu H, et al. Genomic Immune Evasion: Diagnostic and Therapeutic Opportunities in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *J Clin Med*. 2022 Dec 7;11(24):7259.
82. Elmusrati A, Wang J, Wang CY. Tumor microenvironment and immune evasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci*. 2021 Dec;13(1):24.
83. Seiwert TY, Burtneess B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jul;17(7):956–65.
84. Lee JB, Kim HR, Ha SJ. Immune Checkpoint Inhibitors in 10 Years: Contribution of Basic Research and Clinical Application in Cancer Immunotherapy. *Immune Netw*. 2022;22(1):e2.
85. Mehra R, Seiwert TY, Gupta S, Weiss J, Gluck I, Eder JP, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab in recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma: pooled analyses after long-term follow-up in KEYNOTE-012. *Br J Cancer*. 2018 Jul;119(2):153–9.
86. Burtneess B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, De Castro G, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. 2019 Nov;394(10212):1915–28.

87. Harrington KJ, Burtness B, Greil R, Soulières D, Tahara M, De Castro G, et al. Pembrolizumab With or Without Chemotherapy in Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Updated Results of the Phase III KEYNOTE-048 Study. *J Clin Oncol*. 2023 Feb 1;41(4):790–802.
88. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1856–67.
89. Gillison ML, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. CheckMate 141: 1-Year Update and Subgroup Analysis of Nivolumab as First-Line Therapy in Patients with Recurrent/Metastatic Head and Neck Cancer. *The Oncologist*. 2018 Sep 1;23(9):1079–82.
90. Gillison ML, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Long-term Outcomes with Nivolumab as First-line Treatment in Recurrent or Metastatic Head and Neck Cancer: Subgroup Analysis of CheckMate 141. *The Oncologist*. 2022 Mar 4;27(2):e194–8.
91. Miletić M. Nuspojave uzrokovane imunoterapijom. 2021 Oct 22; *Klinika za onkologiju i nuklearnu medicinu, KBC 'Sestre milosrdnice', Zagreb*.
92. Johnson DB, Nebhan CA, Moslehi JJ, Balko JM. Immune-checkpoint inhibitors: long-term implications of toxicity. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022 Apr;19(4):254–67.
93. Choi J, Lee SY. Clinical Characteristics and Treatment of Immune-Related Adverse Events of Immune Checkpoint Inhibitors. *Immune Netw*. 2020;20(1):e9.
94. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). 2017;
95. Xu C, Chen YP, Du XJ, Liu JQ, Huang CL, Chen L, et al. Comparative safety of immune checkpoint inhibitors in cancer: systematic review and network meta-analysis. *BMJ*. 2018 Nov 8;k4226.
96. Haanen J, Carbonnel F, Robert C, Kerr K, Peters S, Larkin J, et al. Management of toxicities from immunotherapy. 2018;
97. Haanen J, Obeid M, Spain L, Carbonnel F, Wang Y, Robert C, et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2022 Dec;33(12):1217–38.
98. Maroun CA, Mandal R. Anti-PD-1 Immune Checkpoint Blockade for Head and Neck Cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 2021 Aug;54(4):751–9.



99. Gavrieliatou N, Doumas S, Economopoulou P, Foukas PG, Psyrri A. Biomarkers for immunotherapy response in head and neck cancer. *Cancer Treat Rev.* 2020 Mar;84:101977.
100. Trujillo JA, Sweis RF, Bao R, Luke JJ. T Cell–Inflamed versus Non-T Cell–Inflamed Tumors: A Conceptual Framework for Cancer Immunotherapy Drug Development and Combination Therapy Selection. *Cancer Immunol Res.* 2018 Sep 1;6(9):990–1000.
101. Kok VC. Current Understanding of the Mechanisms Underlying Immune Evasion From PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Blockade in Head and Neck Cancer. *Front Oncol.* 2020 Feb 28;10:268.
102. Botticelli A, Cirillo A, Strigari L, Valentini F, Cerbelli B, Scagnoli S, et al. Anti–PD-1 and Anti–PD-L1 in Head and Neck Cancer: A Network Meta-Analysis. *Front Immunol.* 2021 Aug 9;12:705096.
103. Yang B, Liu T, Qu Y, Liu H, Zheng SG, Cheng B, et al. Progresses and Perspectives of Anti-PD-1/PD-L1 Antibody Therapy in Head and Neck Cancers. *Front Oncol.* 2018 Nov 28;8:563.
104. Ponce F, Hund S, Peltz L, Placa CL, Vilardo M, Watts B, et al. 60 Use of the Combined Positive Score (CPS) with the companion diagnostic PD-L1 IHC 22C3 pharmDx provides precise evaluation of PD-L1 expression across multiple tumor indications and cutoffs. *J Immunother Cancer.* 2021 Nov;9(Suppl 2):A68–A68.
105. Agilent Technologies, Inc. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual – Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) [Internet]. Agilent Technologies, Inc.; 2019 [cited 2023 Jun 16]. Available from:  
[https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29314\\_22c3\\_pharmDx\\_hnsccl\\_interpretation\\_manual\\_us.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29314_22c3_pharmDx_hnsccl_interpretation_manual_us.pdf)
106. Schildhaus HU. Der prädiktive Wert der PD-L1-Diagnostik. *Pathol.* 2018 Nov;39(6):498–519.
107. Park JC, Krishnakumar HN, Saladi SV. Current and Future Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitors in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Curr Oncol.* 2022 Jun 8;29(6):4185–98.
108. Lewis JS, Beadle B, Bishop JA, Chernock RD, Colasacco C, Lacchetti C, et al. Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med.* 2018 May 1;142(5):559–97.
109. Augustin JG, Lepine C, Morini A, Brunet A, Veyer D, Brochard C, et al. HPV Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: What Is the Issue? *Front Oncol.* 2020 Sep 15;10:1751.

110. Mediatelly [Internet]. [cited 2023 Jun 16]. KEYTRUDA 25 mg/ml koncentrat za otopinu za infuziju - Mediatelly Baza Lijekova. Available from: <https://mediately.co/hr>
111. Mediatelly [Internet]. [cited 2023 Jun 16]. OPDIVO 10 mg/ml koncentrat za otopinu za infuziju - Mediatelly Baza Lijekova. Available from: <https://mediately.co/hr>
112. HALMED. Zbirni popis objavljenih cijena lijekova za 2022. godinu [Internet]. HALMED; 2023 [cited 2023 Jun 16]. Available from: [https://www.halmed.hr/fdsak3jnFsk1Kfa/ostale\\_stranice/Zbirni-popis-objavljenih-cijena-lijekova\\_2022.pdf](https://www.halmed.hr/fdsak3jnFsk1Kfa/ostale_stranice/Zbirni-popis-objavljenih-cijena-lijekova_2022.pdf)
113. Rao YJ, Goodman JF, Haroun F, Bauman JE. Integrating Immunotherapy into Multimodal Treatment of Head and Neck Cancer. *Cancers*. 2023 Jan 21;15(3):672.
114. Stafford M, Kaczmar J. The neoadjuvant paradigm reinvigorated: a review of pre-surgical immunotherapy in HNSCC. *Cancers Head Neck*. 2020 Dec;5(1):4.
115. Uppaluri R, Campbell KM, Egloff AM, Zolkind P, Skidmore ZL, Nussenbaum B, et al. Neoadjuvant and Adjuvant Pembrolizumab in Resectable Locally Advanced, Human Papillomavirus- Unrelated Head and Neck Cancer: A Multicenter, Phase 2 Trial [Internet]. *Oncology*; 2020 Mar [cited 2023 Jun 18]. Available from: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.03.18.20037846>
116. Knochelmann HM, Horton JD, Liu S, Armeson K, Kaczmar JM, Wyatt MM, et al. Neoadjuvant presurgical PD-1 inhibition in oral cavity squamous cell carcinoma. *Cell Rep Med*. 2021 Oct;2(10):100426.
117. Ferris RL, Spanos WC, Leidner R, Gonçalves A, Martens UM, Kyi C, et al. Neoadjuvant nivolumab for patients with resectable HPV-positive and HPV-negative squamous cell carcinomas of the head and neck in the CheckMate 358 trial. *J Immunother Cancer*. 2021 Jun;9(6):e002568.
118. Wise-Draper TM, Gulati S, Palackdharry S, Hinrichs BH, Worden FP, Old MO, et al. Phase II Clinical Trial of Neoadjuvant and Adjuvant Pembrolizumab in Resectable Local–Regionally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2022 Apr 1;28(7):1345–52.
119. Yu WD, Sun G, Li J, Xu J, Wang X. Mechanisms and therapeutic potentials of cancer immunotherapy in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. *Cancer Lett*. 2019 Jun;452:66–70.

120. Wu M, Huang Q, Xie Y, Wu X, Ma H, Zhang Y, et al. Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation. *J Hematol Oncol*. 2022 Mar 12;15(1):24.
121. Hayman TJ, Bhatia AK, Jethwa KR, Young MR, Park HS. Combinations of immunotherapy and radiation therapy in head and neck squamous cell carcinoma: a narrative review. *Transl Cancer Res*. 2021 May;10(5):2571–85.
122. Clump DA, Zandberg DP, Skinner HD, Ohr J, Fenton MJ, Normolle DP, et al. A randomized phase II study evaluating concurrent or sequential fixed-dose immune therapy in combination with cisplatin and intensity-modulated radiotherapy in intermediate- or high-risk, previously untreated, locally advanced head and neck cancer (LA SCCHN). *J Clin Oncol* [Internet]. 2022 Jun 2 [cited 2023 Jun 19]; Available from: [https://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/JCO.2022.40.16\\_suppl.6007?role=tab](https://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.6007?role=tab)
123. National Cancer Institute (NCI). A Phase III Randomized Study of Maintenance Nivolumab Versus Observation in Patients With Locally Advanced, Intermediate Risk HPV Positive OPSCC [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2023 Jun [cited 2023 Jun 17]. Report No.: NCT03811015. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03811015>
124. MD LM. Phase II Randomized Trial of Radiotherapy With Concurrent and Adjuvant Pembrolizumab (Keytruda®) Versus Concurrent Chemotherapy in Patients With Advanced/Intermediate-Risk p16+ Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (KEYCHAIN) [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2023 May [cited 2023 Jun 17]. Report No.: NCT03383094. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03383094>
125. National Cancer Institute (NCI). A Randomized Phase II/III Trial of De-Intensified Radiation Therapy for Patients With Early-Stage, P16-Positive, Non-Smoking Associated Oropharyngeal Cancer [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2023 Jun [cited 2023 Jun 17]. Report No.: NCT03952585. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03952585>

## ŽIVOTOPIS

Morana Belović rođena je 28.09.1997. u Zagrebu. Pohađala je Osnovnu školu 22. lipnja i Glazbenu školu Fran Lothka u Sisku te VII. gimnaziju u Zagrebu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je akademske godine 2016./2017-

Tijekom studija provela je šest godina na Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju kao demonstrator te je tri godine (2020.-2023.) obnašala funkciju predsjednice Pjevačkog zbora studenata Medicinskog fakulteta u Zagrebu *Lege artis*. Početkom akademske godine 2022./2023. postala je članicom vodstva Studentske sekcije za onkologiju i imunologiju.

Sudjelovala je u studentskim projektima Coatian Student Summit (CROSS) kao članica organizacijskog odbora (2018.-2020.) odnosno tehničke službe (2022.), „Promicanje mentalnog zdravlja - Pogled u sebe“ (2018.-2023.) kao vršnjačka edukatorica u srednjim školama i voditeljica edukacije za nove sudionike projekta te „Budi Mrak“, edukativnoj kampanji o prevenciji raka uzrokovanog HPV-om (2020.-2023.) kao vršnjačka edukatorica u srednjim školama.

Dobitnica je Dekanove nagrade za izvrsnost (ak.god. 2017./2018.), Posebnih dekanovih nagrada za promociju i doprinos ugledu Fakulteta (sa zborom *Lege artis*; ak.god. 2017./2018. i 2022./2023.) te dviju Rektorovih nagrada za sudjelovanje u projektima CROSS i „Pogled u sebe“ (ak.god. 2018./2019.).

Njezina područja interesa su onkologija i obiteljska medicina.