

# TLR7 gen i protein u karcinomu pluća nemalih stanica

---

Džubur, Fedža

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:105:438442>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Fedža Džubur**

**TLR7 gen i protein u karcinomu  
pluća nemalih stanica**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2022.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Fedža Džubur**

**TLR7 gen i protein u karcinomu  
pluća nemalih stanica**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena u Kliničkom bolničkom centru Zagreb (Klinika za plućne bolesti Jordanovac) i u Zavodu za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Voditelji rada

**Akademik Miroslav Samaržija**, dr. med., specijalist interne medicine-pulmolog

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb - Klinika za plućne bolesti Jordanovac, Zagreb

**Doc. dr.sc. Jelena Knežević**, viša znanstvena suradnica

Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu medicinu, Zagreb

Zahvaljujem mentorima na nesebičnoj potpori, stručnoj pomoći, strpljenju i savjetima tijekom doktorskog studija, provođenja istraživanja i pisanja ove disertacije.

# SADRŽAJ

Popis oznaka i kratica

1	UVOD.....	1
1.1	Karcinom pluća - epidemiologija.....	1
1.1.1	Patogeneza i klinička slika karcinoma pluća.....	1
1.1.2	Slikovne metode u dijagnostici karcinoma pluća.....	3
1.1.3	Uzimanje uzoraka za citološku/histološku/molekularnu dijagnostiku.....	4
1.1.4	Određivanje stadija karcinoma pluća.....	5
1.1.5	Citološke i histološke karakteristike karcinoma pluća.....	6
1.1.6	Liječenje bolesnika s karcinomom pluća.....	7
1.2	Imunološki sustav i urođena imunost.....	8
1.2.1	Toll-like receptori.....	10
1.2.2	TLR7 receptor.....	14
1.2.3	Poremećaj urođenog imunološkog odgovora - poveznica upale i nastanka karcinoma pluća.....	15
1.2.4	Uloga polimorfizma u genima za Toll-like receptore u razvoju karcinoma pluća....	18
1.3	Svrha rada.....	22
2	HIPOTEZA.....	24
3	CILJEVI RADA.....	25
3.1	Opći cilj rada.....	25
3.2	Specifični ciljevi.....	25
4	MATERIJALI I METODE.....	26
4.1	Plan istraživanja.....	26
4.2	Ispitanici.....	27
4.3	Izolacija genomske DNA iz stanica periferne krvi metodom izoljavanja.....	28
4.4	Odabir polimorfni biljega iz NCBI baza podataka.....	28
4.5	Lančana reakcija polimeraze primjenom specifičnih TaqMan proba.....	28
4.6	Izolacija RNA iz parafinskih kocki.....	30
4.7	Priprema komplementarne DNA (cDNA).....	30
4.8	Priprema plazmidnog konstrukta i mutageneza.....	30
4.9	Uzgoj staničnih kultura.....	32
4.10	Prolazna transfekcija stanica.....	32
4.11	Dual-glo Luciferazni test.....	32
4.12	Imunohistokemijsko bojanje preparata monoklonskim protutijelima i analiza dobivenih rezultata.....	34
4.13	Statistička analiza podataka.....	35
5	REZULTATI.....	37
5.1	Rezultati analize općih karakteristika ispitanika.....	37
5.2	Rezultati analize odabira polimorfni biljega.....	39
5.3	Učinak testiranih SNP-ova na sklonost za razvoj karcinoma pluća nemalih stanica.....	40
5.3.1	Rezultati analize povezanosti polimorfizma rs5935436 CT s rizikom za razvoj karcinoma pluća.....	40

5.3.2	Rezultati analize povezanosti polimorfizma rs12843803 TG s rizikom za razvoj karcinoma pluća .....	41
5.3.3	Rezultati analize povezanosti testiranih polimorfnih biljega s kliničkim parametrima – status TNM, stadij bolesti i preživljenje .....	42
5.4	Rezultati funkcionalne analize varijante gena TLR7 rs5935436.....	45
5.4.1	Rezultati analize ciljane mutageneze i stvaranja konstrukta.....	45
5.4.2	Rezultati dual-glo luciferazne analize.....	46
5.5	Rezultati analize relativne ekspresije gena TLR7 i <i>IFN</i> $\gamma$ i povezanosti s preživljenjem kod osoba s poznatim TLR7 genotipom .....	48
5.6	Rezultati imunohistokemijske analize tumorskog mikrookoliša kod osoba s poznatim TLR7 genotipom .....	52
6	RASPRAVA .....	58
7	ZAKLJUČCI .....	66
8	SAŽETAK .....	67
9	SUMMARY .....	68
10	POPIS LITERATURE .....	69
11	ŽIVOTOPIS .....	81

## Popis oznaka i kratica

CT	kompjutorizirana tomografija ( <i>od engl. computed tomography</i> )
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EBUS	endobronhalni ultrazvuk ( <i>od engl. endobronchial ultrasound</i> )
EGFR	Receptor epidermalnog faktora rasta ( <i>od engl. epidermal growth factor receptor</i> )
HR	omjer rizika ( <i>od engl. hazard ratio</i> )
IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka ( <i>od engl. "International Agency for Research on Cancer"</i> )
IFN	Interferon
IHC	Imunohistokemija ( <i>od engl. Immunohistochemistry</i> )
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
LDCT	kompjuterizirana tomografija s niskom dozom zračenja ( <i>od engl. Low dose computed tomography</i> )
M1	proinflamatorni makrofazi
M2	Imunoregulacijski makrofazi
MDSC	supresorske stanice mijeloidne loze ( <i>od engl. myeloid-derived suppressor cells</i> )
MR	magnetska rezonanca
NSCLC	karcinom pluća nemalih stanica ( <i>od engl. non-small cell lung cancer</i> )
OR	omjer izgleda ( <i>od engl. odds ratio</i> )
OS	ukupno preživljenje ( <i>od engl. overall survival</i> )
PAMP/ DAMP	<i>od engl. Pathogen/Damage Associated Molecular Patterns</i>
PFS	preživljenje bez progresije bolesti ( <i>od engl. progression-free survival</i> )
PCR	lančana reakcija polimeraze ( <i>od engl. Polymerase chain reaction</i> )
PD-L1	ligand programirane stanične smrti 1 ( <i>od engl. Programmed death-ligand 1</i> )
PET	pozitronska emisijska tomografija
PET- CT	pozitronska emisijska tomografija s kompjutoriziranom tomografijom
RNK	ribonukleinska kiselina

ROS1	proto-onkogenska tirozinska proteinska kinaza ( <i>od engl. Proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i> )
SCLC	karcinom pluća malih stanica ( <i>od engl. small cell lung cancer</i> )
TLR	Toll-like receptors
TTF1	Transkripcijski faktor 1 ( <i>od engl. transcription termination factor 1</i> )
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija ( <i>od engl. World Health Organization</i> )



# 1 UVOD

## 1.1 Karcinom pluća - epidemiologija

Karcinom pluća vodeći je uzrok smrti u skupini malignih bolesti širom svijeta. Od karcinoma pluća umire 24% muškaraca i 23% žena, što je značajno viša smrtnost u odnosu na smrtnost uslijed karcinoma prostate i dojke koji su drugi po učestalosti među malignim bolestima (1,2).

Stopa smrtnosti od karcinoma pluća povećavala se tijekom godina, a vrhunac je dosegla devedesetih godina prošlog stoljeća za muškarce, a gotovo dva desetljeća kasnije za žene (1). Smrtnost od karcinoma pluća slijedila je trend povećanja učestalosti pušenja u općoj populaciji, pokazujući time jaku povezanost između pušenja kao glavnog čimbenika rizika za nastanak karcinoma pluća i loše prognoze bolesti (3). Posljednjih nekoliko godina bilježi se konstantan pad stope smrtnosti od karcinoma pluća u oba spola, što je rezultat kombiniranog poboljšanja primarne prevencije, rane dijagnostike, prepoznavanja pridruženih faktora rizika i napretka farmakoterapijskih metoda liječenja (4).

Učestalosti karcinoma pluća u nerazvijenim zemljama trenutno je niža u odnosu na razvijene zemlje, međutim ima stalnu tendenciju rasta uz povećanje stope smrtnosti (4). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) procjenjuje da će se zbog povećane globalne potrošnje duhana povećavati i smrtnost od karcinoma pluća u svijetu (više od milijardu pušača širom svijeta) (4). U Hrvatskoj se godišnje dijagnosticira više od 2900 novih bolesnika s karcinomom pluća, od kojih 85% čine bolesnici s karcinomom pluća nemalih stanica. Incidencija karcinoma pluća u Hrvatskoj jest 68/100.000 stanovnika (5).

### *1.1.1 Patogeneza i klinička slika karcinoma pluća*

Glavna funkcija pluća je disanje, odnosno izmjena plinova. Udahnuti zrak, ali i potencijalno opasne tvari koje se nalaze u našoj okolini, provode se do alveola kroz mrežu bronha i bronhiola. Matične stanice u dišnom sustavu su bazalne stanice za koje se vjeruje da se diferenciraju u cilijarne, mukozne i neuroendokrine stanice. Karcinom pluća može nastati iz svih diferenciranih i nediferenciranih stanica, iz središnjih dijelova (karcinom malih stanica i karcinom pločastih stanica) ili perifernih dijelova pluća (adenokarcinom).

Na patogenezu karcinoma pluća utječe i genetska komponenta koja se odnosi na sklonost domaćina za razvoj karcinoma, sa ili bez izloženosti kancerogenim tvarima. Iako studije o genetskoj predispoziciji podržavaju navedenu hipotezu o multifaktorijalnom nastanku, jasan mehanizam genetskog naslijeđivanja još uvijek nije potvrđen (6). Pušenje u kombinaciji s pozitivnom obiteljskom anamnezom trostruko povećava rizik za razvoj karcinoma pluća (6). Interakcija između udahnutih kancerogenih tvari i epitela gornjih i donjih dišnih putova dovodi do stvaranja oštećenja DNK koja onemogućavaju popravljanje ili uklanjanje stanica s oštećenim DNK. Ako se DNK promjene nastave nakupljati ili su pogrešno popravljene, obično rezultiraju mutacijama i genomskim promjenama. Ključne su DNK-a promjene na pozicijama koje kodiraju protoonkogene i tumor supresorske gene (6).

Znanstveno je prihvaćenu teorija nastanka karcinoma pločastih stanica iz maligno alteriranih epitelnih stanica preko karcinoma *in situ* do klinički značajnog karcinoma, te adenokarcinoma iz atipične adenomatozne hiperplazije i preinvazivnog adenokarcinom *in situ* do invazivnog karcinoma (7). S obzirom na navedenu teoriju postoji tendencija pronalaska kemoprotektivnog sredstva koje bi smanjilo pojavnost karcinoma pluća. Rezultati meta-analize o učinku dugoročnog uzimanja aspirina i smanjenja smrtnosti od karcinoma ističu aspirin kao jedan od najperspektivnijih supstanci za prevenciju razvoja karcinoma (8).

Kod 25% bolesnika s karcinomom pluća bolest je otkrivena slučajno na rutinskoj RTG snimci pluća ili CT-u (2). Oboljeli od karcinoma malih stanica često ne navode nikakve simptome ni znakove bolesti. Simptomi koji ukazuju na karcinoma pluća su različiti, a ovise o tome u kojem je dijelu pluća karcinom smješten i koliko je proširen. U osoba s karcinomom pluća mogu biti prisutni kašalj, hemoptiza, dispneja, stridorozno disanje, bol u prsima (pleuralna bol, bol u rebrima i leđima), promuklost (lijevi rekurentni laringealni živac), disfagija, paraliza dijafragme, sindrom gornje šuplje vene, Pancoastov sindrom (bol u ramenu, Hornerov sindrom) (1,2). Većina karcinoma dijagnosticiranih niskodoznim CT probirom su adenokarcinomi perifernog smještaja, međutim istovremeno tim probirom možemo analizirati i patološke promjene drugih organa i organskih sustava, primjerice možemo prikazati kalcifikate koronarnih krvnih žila, čvorove u dojka ili štitnjači (9-11). Potencijalni biomarkeri za probir karcinoma pluća uključuju protutijela u serumu, hiper-metilaciju DNK u sputumu, proteomične metode i serumsku mikro RNK (12).

U bolesnika s udaljenim metastazama (mozak, kosti, jetra, nadbubrežna žlijezda) mogu se javiti gubitak apetita i tjelesne težine, umor i nelagoda. Paraneoplastički sindrom se javlja u oko 10% bolesnika s karcinomom pluća (2). Ovisno o paraneoplastičkom lučenju tvari mogu

se javiti sljedeći sindromi: hiponatremija, hiperkalcemija, Cushingov sindrom, ginekomastija, galaktoreja, itd. Od rijedih manifestacija karcinoma pluća opisane su mišićno-koštana hipertrofična osteoartropatija s udruženim polimiozitisom, dermatomiozitis, miopatija te neurološki entiteti kao što su Lambert-Eatonova miastenija, cerebelarna degeneracija iencefalitis (13). U literaturi su opisane i hematološke manifestacije/komplikacije karcinoma pluća (anemija, trombocitoza, leukocitoza, nebakterijski trombotski endokarditis), te kožne (svrbež, multififormni eritem, acanthosis nigricans) (13).

### *1.1.2 Slikovne metode u dijagnostici karcinoma pluća*

Rendgenska snimka pluća je prvi dijagnostički postupak u bolesnika s prisutnim simptomima karcinoma pluća. Standard snimanja je snimak u dvije projekcije: sprijeda- straga i snimka iz profila. RTG snimka može otkriti suspektnu sjenu na plućima, ali ne može utvrditi je li ta sjena maligna. Konkretno, kalcificirani čvorovi u plućima ili hamartomi mogu na RTG snimci izgledati kao karcinom pluća (14). CT-om se mogu napraviti snimke više organa i organskih sustava (prsišta, trbuha, mozga), te tako dobiti adekvatne informacije o opsegu ili lokalizaciji tumora. CT uključuje ionizirajuće zračenje, a uz pomoć računalnog programa kombinira više slika i generira slikovni presjek ljudskog tijela. Prednost CT-a u odnosu na standardne RTG snimke pluća je veća osjetljivost u otkrivanju čvorova u plućima te bolja preciznost njihove lokalizacije (14). CT abdomena može identificirati metastatski karcinom u jetri ili nadbubrežnim žlijezdama, a CT glave otkriva prisutnost i opseg metastaza u mozgu (10).

Magnetska rezonancija (MR) se koristi s ciljem precizne lokalizacije tumora ili metastaze. Zbog tehničkih nedostataka osjetljivost pretrage je bolja kod snimanja mozga nego plućnog tkiva (14). Pozitronska emisijska tomografija (PET) je specijalna slikovna tehnika koja koristi kratkoživuće radionuklidne tvari za proizvodnju trodimenzionalne slike (14). CT i MR daju informaciju o anatomiji tj. strukturi tkiva, a PET skenira metaboličku aktivnosti i funkciju tkiva. Primjera radi, kombinacija glukoze (zajednički izvor energije u tijelu) s radioaktivnom tvari dovest će do pojačanog nakupljanja tog kompleksa na mjestima gdje se ona najbrže troši, dakle na mjestu gdje je lokaliziran tumor. Skener evidentira gama zrake nastale nakon sudara pozitrona s elektronom. Gustoća gama zraka je veća na području jačeg nakupljanja radioaktivne tvari PET skeniranje obično je integrirano s CT skeniranjem u tehnici poznatoj

kao PET-CT skeniranje. Integrirani PET-CT je pokazao veću točnost i preciznost u lokalizaciji tumorskih stanica u odnosu na klasični PET sken (10,14).

Sken kostiju ili scintigrafija kostiju se koristi kako bi se utvrdilo postojanje metastatskih lezija karcinoma pluća u području kosti. Kod scintigrafije kostiju, mala količina radioaktivno obilježenog bisfosfonata se ubrizgava u krvotok i nakuplja u kostima, posebno u području abnormalne pregradnje kostiju kao što je područje metastatskih promjena (2,14).

### *1.1.3 Uzimanje uzoraka za citološku/histološku/molekularnu dijagnostiku*

Uz navedne dijagnostičke metode potrebno je pribaviti i obraditi tumorsko tkivo za citološku/histološku analizu te učiniti molekularno i genetsko testiranje tumorskih stanica. Danas koristimo niz različitih invazivnih tehnika pri kojima iglenom biopsijom ili bioptičkim kliještima dobivamo uzorke za daljnju analizu. Pri odabiru tehnike uzimanja materijala moramo uzeti u obzir osjetljivost i specifičnost pretrage s obzirom na položaj tumora, invazivnost i rizik postupka, dostupnost pretrage i lokalnu stručnost osoblja. Trenutno se za dijagnostiku karcinoma pluća najviše koriste endoskopske tehnike poput endobronhalne biopsije, transbronhalne biopsije, radijalnom sondom vođenog endobronhalnog ultrazvuka (EBUS), transbronhalne iglene aspiracije kontrolirane EBUS-om (EBUS-TBNA), te aspiracije tankom iglom pod kontrolom endoskopskog ultrazvuka (15). Za periferne lezije i lezije drugih parenhimskih organa koristimo biopsije pod kontrolom CT-a odnosno ultrazvuka, a za lezije u centralnom dijelu pluća i medijastinumu koristimo biopsije pod kontrolom endoskopskog ultrazvuka (14,15).

Karcinom pluća može zahvatiti i pleuru te dovesti do nakupljanja tekućine u prostoru između pluća i prsnog koša pri čemu nastaje pleuralni izljev. Uzimanje uzorka pleuralnog izljeva s tankom iglom (torakocenteza) može otkriti stanice karcinoma i dati točnu dijagnozu. Kod ovoga zahvata, kao i kod iglene aspiracijske biopsije, postoji malen rizik od pneumotoraksa.

Ako ni jedna od spomenutih metoda nije rezultirala postavljanjem dijagnoze, za dobivanje uzorka tumorskog tkiva potrebno je učiniti kiruršku biopsiju. To može uključivati medijastinoskopiju (direktna inspekcija prsnog koša i sredoprsja, kroz kirurški postavljenu sondu za biopsiju tumorske mase ili limfnih čvorova/ metastaza) ili torakotomije (kirurško otvaranje prsnog koša radi uklanjanja ili biopsije tumora) (16).

### 1.1.4 Određivanje stadija karcinoma pluća

Stadij karcinoma opisuje proširenost karcinoma u tijelu. Određivanje stadija uključuje procjenu veličine karcinoma, zahvaćenost okolnog tkiva te prisutnost ili odsutnost metastaza u limfnim čvorovima ili u udaljenim organima. Stadijevanje (engl. staging) je važno za određivanje modaliteta liječenja raka pluća te za procjenu prognoze bolesti. Viši stadij bolesti ukazuje na proširenu bolest i ima značajno lošiju prognozu (17).

TNM klasifikiranje je multidisciplinarni postupak koji uključuje fizikalni pregled, endoskopske, slikovne i kirurške tehnike za utvrđivanje proširenosti bolesti. Trenutno je važeće 8. izdanje TNM-a i temelji se isključivo na anatomiji (17). Stadij bolesti najvažniji je prognostički faktor za karcinom pluća (2,10,17).

Slika 1. TNM klasifikacija tumora pluća (8. izdanje)

TNM 8.- Značajke primarnog tumora	
Tx	tumor u sputumu/bronhalnom aspiratu, ali nije vidljiv radiološkim metodama ili bronhoskopski
To	tumor nije dokazan
Tis	Karcinom in situ
T1	≤ 3 cm okružen plućima/visceralnom pleurom, glavni bronh nije zahvaćen
T1a(mi)	Minimalno invazivni karcinom
T1a	≤ 1 cm
T1b	> 1 cm, ≤ 2 cm
T1c	> 2 cm, ≤ 3 cm
T2	>3 cm, ≤ 5 cm; ili zahvaća glavni bronh bez karine, bez obzira na njenu udaljenost; ili zahvaća visceralnu pleuru; ili atelektaza/postopstruktivni pneumonitis koji se širi do hilusa
T2a	> 3cm, ≤ 4 cm
T2b	> 4 cm, ≤ 5 cm
T3	najveća dimenzija tumora > 5cm i ≤ 7 cm ili tumor bilo koje veličine koji zahvaća stijenku toraksa, perikard, frenikus ili ima satelitske čvorove u istom režnju
T4	> 7 cm ili bilo koji tumor koji zahvaća medijastinum, ošit, srce, velike krvne žile, rekurentni laringealni živac, karinu, traheju, jednjak, kralježnicu ili zaseban tumor u drugom režnju istostranog plućnog krila
N1	zahvaćeni istostrani peribronhalni i/ili hilusni čvorovi, i intrapulmonalni čvorovi
N2	zahvaćeni istostrani medijastinalni i/ili subkarinalni limfni čvorovi
N3	zahvaćeni kontralateralni medijastinalni ili hilusni čvorovi; istostrani/kontralateralni skalenski/supraklavikularni čvor
M1	udaljene metastaze
M1a	tumor u kontralateralnom plućnom krilu ili pleuralni/perikardijalni čvor ili maligni pleuralni izljev
M1b	jedna ekstrapulmonalna metastaza, uključujući neregionalni limfni čvor
M1c	višestruke ekstrapulmonalne metastaze u jednom ili više organa

Za što preciznije određivanje stadija bolesti koriste se kombinacije različitih dijagnostičkih metoda koji uključuju analiziranje serumskih biomarkera, RTG, CT, torakocentezu, scintigrafiju kostiju, endoskopski ultrazvuk, torakoskopiju, videomedijastinoskopiju, MR i PET-CT. Patološki nalazi serumskih biomarkera mogu ukazati na postojanje metastaza, a slikovne metode to verificiraju (16).

### *1.1.5 Citološke i histološke karakteristike karcinoma pluća*

Povijesno te na temelju terapijskih mogućnosti i citološkog/ histološkog izgleda i ekspresije pojedinih markera, karcinom pluća dijelimo u dvije osnovne skupine: karcinom pluća malih stanica (SCLC, oko 15%) i karcinom pluća nemalih stanica (NSCLC). Kao rijetki entiteti pojavljuju se i karcinomi podrijetlom iz žlijezda slinovnica, karcinoidi, no oni nisu od kliničkog značaja. NSCLC se klasificira kao adenokarcinom, karcinom pločastih stanica, adenoskvamozni karcinom, karcinom velikih stanica i neuroendokrini tumor velikih stanica. Tumori pluća često mogu imati kombiniranu histološku sliku. Centralno smješteni adenokarcinomi nastaju iz žljezdanog epitela bronha, nasuprot periferno smještenim adenokarcinomima kojima su prekursori promjenjena egzokrina bronhiolarna stanica i pneumocit tipa II. Planocelularni karcinom nastaje nakon skvamozne metaplazije dišnog epitela, obično kao posljedica kronične upale povezane s pušenjem. Kod pušača je opisana i pojava višestrukih sinkronih NSCLC-ova (18,19). Adenokarcinome karakteriziraju različiti histomorfološki obrasci rasta. Polukvantitativna procjena ovih obrazaca daje dodatne podatke za optimizirano liječenje. Prevladavajući obrazac rasta adenokarcinoma povezan je s ishodom bolesti. Specifični obrasci rasta adenokarcinoma povezani su s različitim biološkim ponašanjem tumora, prevalencijom prediktivnih biomarkera i metastazama u limfnim čvorovima. Mikropapilarni, papilarni, solidi i acinarni oblici puno češće daju metastaze u limfne čvorove u odnosu na lepidički rast tumora (19). Za pouzdanu dijagnozu podtipa tumora potrebno je potvrdno bojenje na specifične antigene. Transkripcijski faktor štitnjače 1 (TTF1) i napsin A često se koriste za potvrdu adenokarcinoma pluća; p63 (p40) i citokeratin 5/6 koriste se kao markeri za skvamozni karcinom. Neuroendokrini diferencijacija potvrđuje se s antitijelom na kromogranin A, sinaptofizin ili CD56. Imunohistokemija zahtijeva pažljivu korelaciju s morfološkim nalazom da se definira imunofenotip neoplastičnih stanica (1,18,20).

### *1.1.6 Liječenje bolesnika s karcinomom pluća*

Liječenje bolesnika s karcinomom pluća ovisi o tipu tumora (karcinom nemalih stanica adenokarcinom, skvamozni karcinom te karcinom malih stanica), stadiju bolesti, molekularnim karakteristikama tumora i procjeni ukupnog zdravstvenog stanja bolesnika (2,17). Kod bolesnika s karcinomom pluća (NSCLC) stadija I, II ili IIIa postoji mogućnost kirurške resekcije uz adjuvantnu kemoterapiju, radioterapiju ili kombiniranim pristupom ovisno o stadiju bolesti. Bolesnici sa stadij bolesti IIIb i IV obično nisu pogodni za kiruršku resekciju. Imunoterapija može biti dio strategije liječenja za bolesnike s neresektabilnom bolešću III. stadija. Sustavna terapija je općenito indicirana za bolesnike koji imaju proširenu bolest, uključujući one koji imaju metastaze (stadij IV) ili recidiv bolesti. U bolesnika sa solitarnom metastazom može se učiniti kirurška resekcija ili iradijacija navedene lezije. Sustavna terapija i/ili metastazektomija koristi se također za bolesnike koji imaju recidiv nakon prethodno završenog liječenja (17,21–25). Bolesnici s karcinomom pluća nemalih stanica stadija I i II liječe se radikalnom resekcijom primarnog tumora. Da bi se postiglo potpuno kirurško izlječenje, potrebno je učiniti kompletnu medijastinalnu limfadenektomiju (23). U slučaju lokalno uznapredovalog karcinoma pluća (T3N1, T4N0-1), radikalna resekcija može biti postignuta sa ili bez neoadjuvante kemoterapije (23). Bolesnici s ograničenom limfadenopatijom medijastinuma kojima će biti aplicirana neoadjuvanta terapija, mogu biti kandidati za radikalnu resekciju nakon smanjenja tumora/limfnih čvorova i smanjenja stadija bolesti (1,17,23). Cilj liječenja bolesnika s karcinomom pluća je povećati preživljenje uz očuvanje što bolje kvalitete života i uz što manje nuspojava liječenja. Pristup bi svakako trebao uključiti i palijativnu skrb bolesnika (26,27). Čimbenici koji utječu na odabir početne terapije NSCLC-a osim same proširenosti bolesti su: prisutnost razine ekspresije liganda1 programirane stanične smrti (PD-L1), prisutnost ili odsutnost mutacije za koju je dostupan određeni inhibitor, npr. receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR), kinaza-anaplastičnog limfoma (ALK), c-ROS onkogen, ROS1, BRAF te skvamozna nasuprot neskvamozne histologije (25-30). Ukoliko su mutacije odsutne ili nepoznate a radi se o proširenoj ili lokalno uznapredovaloj bolesti, početna sistemska terapija ovisi o ekspresiji staničnog liganda-1 programirane smrti stanice (28-36).

## 1.2 Imunološki sustav i urođena imunost

Imunološki sustav štiti organizam od napada mikroorganizama (virusa, bakterija, gljivica i parazita), njihovih kemijskih supstanci (toksina), kao i vlastitih mutiranih (npr. tumorskih) ili istrošenih stanica. Imunološki sustav se sastoji od organa te pojedinačnih stanica koje mogu migrirati u tijelu i na taj način sudjelovati u obrani organizma. Temeljni organi imunološkog sustava su koštana srž, timus te limfni čvorovi. Razlikujemo dvije vrste imunosti, stečenu tj. specifičnu i urođenu tj. nespecifičnu imunost (37).

Stečena imunost može biti prirodno ili umjetno stečena, pasivnim ili aktivnim putem, dakle razvija se u kontaktu s uzročnicima bolesti, ne postoji prije prvog kontakta i potrebni su dani, tjedni ili mjeseci da bi se u potpunosti razvila (37,38). Urođena (nespecifična) imunost jest otpornost organizma na strane tvari tj. antigene s kojima nije došao nikad ranije u kontakt (37). Ova vrsta imunosti nije specifično usmjerena protiv pojedinačnih antigena koji narušavaju integritet. Predstavlja prvu liniju obrane i već od rođenja osigurava jako dobru zaštitu protiv većine mikroorganizama, ali i ostalih noxi (37). Nespecifična se imunost temelji na anatomskim, fiziološkim i fagocitnim zaprekama, upali, efektorskim proteinima te intraepitelnim B i T limfocitima. Anatomske barijere kao što su koža i sluznice zajedno sa svojim kemijskim tvarima u sekretima najvažnije su u nespecifičnoj obrani jer štite organizam od prodora brojnih stranih tvari i mikroorganizama (38). Mali broj mikroorganizama može proći kroz prirodne barijere, jer se površinski sloj kože sastoji od gustog sloja stanica keratinocita koje mikroorganizmi ne mogu razgraditi enzimima. Stalna izmjena površinskog sloja kože i sluznica, zajedno s mrtvim epitelnim stanicama, sprečava naseljavanje mikroorganizama na koži. Nadalje, fiziološke zapreke poput tjelesne temperature, pH tkiva te sadržaja pojedinih tvari u tkivima (npr. lizozim, interferon, komplement) sudjeluju u nespecifičnoj obrani jer djeluju mikrobicidno. Stanice odgovorne za imunost nazivaju se leukociti, odnosno bijele krvne stanice. Svi leukociti su podrijetlom iz koštane srži odnosno iz jetre fetusa, iz njih migriraju u različite dijelove organizma gdje se razvijaju, diferenciraju i postaju specifične stanice. Neke stanice zauvijek migriraju u tkiva, i obavještavaju organizam kada dođe do prekida kontinuiteta sluznice/kože, upale ili infekcije. Intraepitelni B i T limfociti (sadrže  $\gamma$  i  $\delta$  lance u T staničnom receptoru) prepoznaju ugljikohidratne i lipidne molekule na površini različitih bakterija odnosno antitijela.



Osim prodora mikroorganizama i drugih stranih tvari, urođena imunost sudjeluje u održavanju antigenskog i genetskog integriteta organizma (38). Od leukocita koji sudjeluju u urođenoj imunosti najbitniji su fagociti (monocitno-makrofagna loza, neutrofilii) i stanice prirodne ubojice (od engl. natural killer- NK stanice). Njihova uloga nije samo u "čišćenju" organizma, već su i aktivni sudionici te sastavnica specifične imunosti (38). Dolaskom u pojedina tkiva i organe fagociti i NK stanice pronalaze, fagocitiraju i razgrađuju mikroorganizme i različite strane tvari, kao i vlastite stanice aberantne po formi ili položaju u tkivu (39). NK stanice su bitne u slučaju infekcije stanica virusom ili njene maligne alteracije. Nasuprot njima mononuklearne stanice kao što su monociti i makrofagi posjeduju receptore za antitijela koja se vežu za površinu stranih čestica i procesom koji se naziva opsonizacija fagocitiraju strane čestice. Granulociti (neutrofilii, bazofili i eozinofili) su stanice nepravilnog oblika, još se nazivaju i polimorfnim nuklearnim leukocitima koji migriraju na mjesto oštećenja, gdje zajedno sa makrofazima imaju ulogu fagocitnih stanica te produkciji citokina i efektorskih proteina (39).

Cirkulirajući efektorski proteini kao što su komponente komplemanta, lizozim, properdin i proteini akutne faze upale su humoralni faktori imunosti prisutni u krvi i izvanstaničnoj tekućini. Imaju važnu ulogu u procesima kemotaksije, opsonizacije i liziranja bakterija. S druge strane citokini su kemijske tvari koje proizvode različite stanice organizma, a osnovna uloga im je u međustaničnom komuniciranju. U urođeni imunološki odgovor uključeni su sljedeći citokini: interfeferon  $\alpha$  i interfeferon  $\beta$  (imaju važnu ulogu u borbi protiv virusa), interleukin 1 i faktor nekroze tumora (TNF, koji su bitni medijatori upale) interleukin 15 i interleukin 12 (aktiviraju NK stanice), interfeferon  $\gamma$  (sudjeluje u aktivaciji makrofaga), interleukin 10 i transformirajući faktor rasta  $\beta$  (koji služe za smirivanje i ograničavanje upalnog odgovora) te interleukin 6 koji stimulira upalni odgovor kroz sintezu proteina akutne upale i potiče stvaranje granulocita (37–39).

Na biološko, kemijsko ili fizičko oštećenje, organizam reagira upalnom reakcijom. Upala je uvertira u svaku specifičnu imunološku reakciju, a riječ je o nizu vaskularnih, neuroloških, humoralnih i celularnih događanja koji najprije razaraju ili ograđuju štetnu tvar (39). Ako antigen zaobiđe navedenu zaštitu, specifična (stečena) imunost počinje djelovati u suradnji s nespecifičnom imunosti. One su međusobno integrirane i gotovo ih je nemoguće zasebno promatrati. Zajedničkim djelovanjem one se nadopunjuju i na taj način postižu djelotvorniju obranu od različitih noksii (37,38). Na djelotvornost nespecifične obrane utječu brojni činitelji

kao što su spol, dob, genetska podloga, prehrana, razne bolesti jedinke te primjena imunosupresivnih i imunostimulacijskih tvari (37).

### 1.2.1 Toll-like receptori

*Toll-like receptori (TLR)* pripadaju skupini evolucijski očuvanih receptorskih proteina PRR (od engl. Pattern Recognition Receptors) koji domaćinu omogućavaju prepoznavanje patogenu pridruženih molekularnih slijedova (tzv. PAMPs, od engl. Pathogen Associated Molecular Patterns) ili oštećenje pridruženih molekularnih slijedova (tzv. DAMPs, od engl. Damage Associated Molecular Patterns) (38,40). Smatra se da PRR-i imaju ključnu ulogu u urođenom imunološkom odgovoru (39–42). Osim *TLR* receptora, u ovu obitelj spadaju još i lektinski receptori tipa C (CLR), receptori retinoinskom kiselinom induciranih gena (RLR), receptori nalik nukleotidnoj oligomerizacijskoj domeni (NLR) i formil peptidni receptori (FPR) (39,40,43,44). PRR-ovi su konstitutivno izraženi na nekoliko tipova stanica, uključujući imunološke, endotelne i epitelne stanice. Oni održavaju regrutaciju i aktivaciju imunih stanica i reguliraju cijeljenje rana i homeostazu epitela. PRR-ovi su sposobni inicirati upalu, ali neki od njih također mogu promovirati njezino rješavanje, ovisno o okolišu i specifičnom ligandu (40,45–47). Odgovor urođenog imunološkog sustava se pokreće od strane PRR-a izraženih na makrofazima i dendritičkim stanicama kao osnovnim stanicama imunološkog sustava (48). Osim njih, endotelne i epitelne stanice te fibroblasti imaju izraženu PRR aktivnost, čime dodatno pojačavaju imunološki odgovor (49–51). Nakon vezanja patogenih liganada te aktiviranja, PRR-ovi započinju različite funkcije kao što su opsonizacija/fagocitiranje, aktivacija sustava komplementa, kemotaksija te izlučivanje proupalnih izvršnih molekula (50–52). Opsonizaciju i početak fagocitiranja (postupka kojim fagociti označavaju patogen za proces uvlačenja u stanicu i uklanjanja patogena) pokreću topivi izvanstanični PRR-i koji čine humoralni krak urođenog imunološkog sustava (39). Osim PRR-ova odgovornih za fagocitozu, razni transmembranski i citoplazmatski PRR-ovi vežu strukturne elemente patogena kako bi pokrenuli upalni odgovor koji aktivira unutrastanične signalne putove čija je krajnja točka transkripcijska regulacija gena koji kontroliraju proizvodnju proupalnih citokina i kemokina (39,50).

Dakle, urođena imunost se temelji na anatomskim, fiziološkim i fagocitnim zaprekama, upali, efektorskim proteinima te intraepitelnim B i T limfocitima. U respiratornom sustavu, lokalnu

obranu predstavlja epitel koji blokira ulazak udahnutih patogena i štetnih čestica, a sustavna urođena imunost posredovana je cirkulirajućim imunološkim stanicama i efektorskim proteinima. U trenutku kada anatomska barijera bude probijena, dolazi do aktivacije rezidencijalnih alveolarni makrofaga, koji su senzori patogena te oni dalje potiču regrutiranje imunoloških stanica u alveolama uz porast efektorskih proteina i nastanak upale (53). Makrofazi počinju producirati veću razinu efektorskih upalnih proteina i citokina koji djeluju destruktivno na patogene. Citokini, kemokini i komponente sustava komplekta oslobođeni iz aktiviranih epitelnih stanica ili rezidencijalnih makrofaga privlače i aktiviraju izvršne stanice modelirajući lokalni imunološki odgovor, a aktivacija PRR-a specifičnim ligandima ima izuzetno važnu ulogu u tim procesima. S druge strane postoje i protuupalni makrofazi koji pokazuju povećanu sposobnost čišćenja mrtvih ili apoptotskih stanica fagocitozom te stvaraju protuupalne citokine i posrednike popravka i preinake tkiva (54-56).

Okvirni model mehanizma prepoznavanja mikrobnog obrasca prvi je opisao Charles Janeway Jr. uz dvije osnovne značajke: sposobnost razlikovanja infektivnih molekula od vlastitih zdravih molekula te sposobnost aktiviranja stečenog imunološkog odgovora na strane molekule (53).

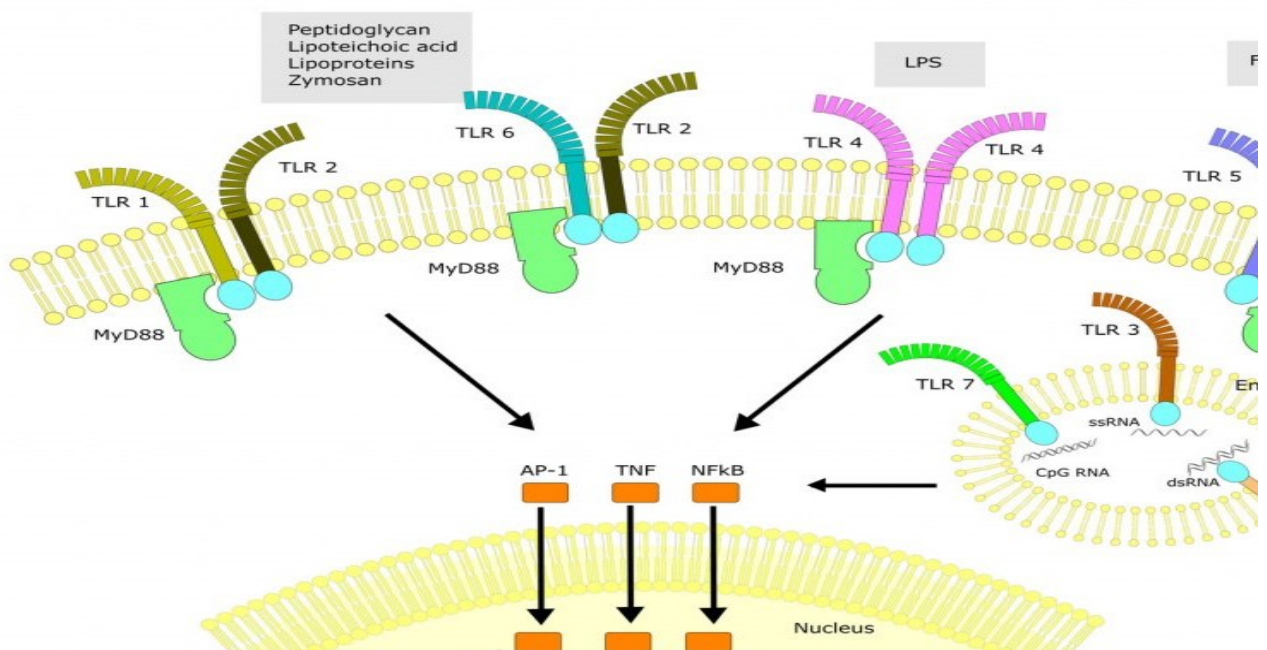
Najvažnija skupina unutar porodice PPR-ova su TLR-ovi koji specifično prepoznaju i vežu brojne ligande podrijetlom od patogena (bakterijski flagelin, polipeptide, glikoproteine te virusnu RNA i DNA) aktivirajući urođeni i stečeni imunski odgovor (40,41). TLR su dobili naziv prema genu Toll (od njem. izvanredno, odlično), otkrivenom u vinskoj mušici, čiji proteinski produkt sudjeluje u razvoju dorzo-ventralne osi tijekom embriogeneze, a kasnije u obrani od gljivičnih infekcija. U sisavaca je prvo otkriven TLR4, receptor analogan Toll proteinu vinske mušice, a zatim još 12 različitih TLR-a, nazvanih TLR1 do TLR13 (40).

TLR-i dakle pripadaju obitelji transmembranskih glikoproteinskih receptora koji imaju tri domene: izvanstaničnu, transmembranski dio te unutarstaničnu tj. citoplazmatsku građevnu domenu (57). TLR-i postoje na plazmatskoj membrani kao monomeri, ali za pokretanje unutarstanične signalizacije potrebna je dimerizacija s istovjetnim TLR-om (homo-dimerizacije) ili s različitim TLR-om (hetero-dimerizacija) (58). Građa izvanstanične domene TLR-a se uspoređuje s potkovom; na N-završetku ima LRR sekvencu (*engl. LRRs, leucine rich repeats*) koja pruža strukturalni okvir za vezanje specifičnog liganda. LRR je proteinska struktura sastavljena od 20-30 aminokiselinskih ponavljanja koja sadrže usklađeni slijed LXXLXLXXNXL, gdje je L jedna od aminokiselina razgranatog glanca (leucin, izoleucin ili valin), N je ostatak asparagina, cisteina ili treonina, a X bilo koja druga aminokiselina (57).

Citoplazmatska tj. unutarstanična domena se označava kao Toll / IL-1R (TIR) jer dijeli sličnost s interleukin-1 receptorom (IL-1R) i sudjeluje u prijenosu signala i interakciji s adaptornim proteinima (59). TLR adaptorni proteini doprinose raznolikosti signalnih puteva pokrenutih aktivacijom TLR-a. TLR-i nakon stimulacije ligandom putem TIR domene pokreću unutarstanični odgovor. Ovisno o adaptornom proteinu mogu aktivirati različite odgovore tj. različit obrazac unutarstaničnog odgovora. Najčešće regrutirane adaptorne molekule su TIRAP (engl. *Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein*), MyD88 (engl. *myeloid differentiation primary-response protein 88*), TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ) i TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (60).

Osim molekularnih slijedova povezanih s patogenima, TLR-i prepoznaju i endogene ligande koji se oslobađaju tijekom nekroze stanica domaćina uzrokovane upalom. Upravo su smještaj u stanici, ekspresija u različitim tkivima, specifičnost prema ligandima te način prijenosa signala svojstva prema kojima se TLR međusobno razlikuju (slika 2). TLR 3, 7, 8 i 9 pretežno su smješteni unutarstanično, na membrani endosoma i prepoznaju unutarstanične ligande, poput nukleinskih kiselina. Ostali TLR smješteni su na površini stanica i prepoznaju ligande podrijetlom od patogena. Signalizacija putem TLR-a i njihova povezanost sa proizvodnjom proupalnih citokina i razvojem karcinoma prikazana je na Slici 2.

Slika 2. Toll-like receptori i njihovi ligandi. TLR 3, 7, 8 i 9 smješteni su unutar stanice, a ostali TLR nalaze se na površini stanice (*preuzeto i prilagođeno iz rada od rada Kawasaki T et Kwai T. Toll like receptor signaling pathways. Vol.5, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A. 2014.*)



Razlika između TLR7 i TLR8 i ostalih unutarstaničnih TLR-ova jest da vežu jednolančanu virusnu RNA (ssRNA), dok je TLR9 receptor za bakterijsku DNA koja sadrži nemetilirane slijedove CpG, a TLR3 prepoznaje i veže dvolančanu RNA (dsRNA).

TLR i skupina receptora za interleukin-1 (IL-1R) imaju homolognu citoplazmatsku domenu nazvanu TIR (od engl. Toll/IL-1 Receptor). Domena TIR se može podijeliti u 3 podjedinice; Box1, Box2 i Box3 koje su ključne u prijenosu signala (40,42).

Posljedica pokretanja prijenosa signala putem TLR-a je aktivacija transkripcijskih faktora NF-κB (engl. Nuclear Factor-κB), AP-1 (engl. Activating Protein-1) i IRF-3 (engl. Interferon Regulatory Factor 3), čime se pokreće transkripcija gena koji kodiraju proteine uključene u

imunosti odgovor kao što su adhezijske molekule, kemokini, upalni citokini, interferon. Na kraju dolazi do različitih učinaka na stanice i tkiva: aktivacije urođenog i stečenog imunskog odgovora, autoimune reakcije, sistemskog upalnog odgovora, apoptoze, itd. (39,42).

Pneumociti tipa II (alveolarne epitelne stanice tipa II) kao i epitelne stanice bronha te alveolarni makrofazi imaju izražene TLR receptore (od TLR1 do TLR10) i mogu povećati njihovu ekspresiju na svojoj površini u uvjetima infekcije, a osobitu ekspresiju ovih receptora imaju i tumorske stanice karcinoma pluća (61-63).

### 1.2.2 TLR7 receptor

Receptor TLR7 izražen je unutarstanično na stijenkama endoplazmatskog retikuluma, konkretno na stanicama imunološkog sustava uključujući plazmocitne i mijeloidne dendritičke stanice, makrofage, B limfocite i NK stanice (44,46). Aktivacija ovih stanica s TLR7 agonistima potiče produkciju upalnih citokina. Niske razine TLR7 pronađene su i u neimunim stanicama kao što su hepatociti, epitelne stanice i keratinociti (64, 65).

Također je dobro poznato da mnoge stanice tumora ispoljavaju funkcionalni receptor TLR7 i da njegovom stimulacijom specifičnim ligandima može doći do progresije samog tumora ili rezistencije na antitumorsku terapiju (47). TLR7 agonisti primarno aktiviraju plazmatske dendritičke stanice, B stanice i monocite, a stimulacija signalnih puteva preko TLR7 rezultira i aktivacijom središnjih transkripcijskih čimbenika, posebno NF- $\kappa$ B (nuklearni faktor-kappa B) (66). Istraživanja su pokazala da TLR7 može poticati ali i blokirati rast tumora, ovisno o signalnom putu koji je pokrent i mikrookolišu (45). Aktivacija TLR7 receptora može stimulirati lučenje IFN $\gamma$  i poticanje na upalni odgovor, stoga je ciljanje na TLR7 receptore obećavajuća strategija za antivirusnu i antitumorsku terapiju (67,68). Intratumorska aplikacija TLR7 agonista modificira tumorski mikrookoliš od progresije tumora do inhibicije rasta i širenja tumorskih stanica promjenom dominantnih makrofaga (iz M1 u M2 oblik) (69).

U in vitro studijama na staničnoj liniji ljudskog raka pluća tretiranoj s TLR7 ligandom imikvimodom uočena je povezanost ekspresije upravo TLR7 receptora i regresije karcinoma pluća (48). S obzirom da je TLR7 izražen ne samo na tumorskim stanicama NSCLC-a nego i na stanicama koje čine imunološki sustav obrane od karcinoma, istraživanje uloge TLR7 u tijeku i liječenju ovog izrazito malignog karcinoma od iznimne je važnosti.

### *1.2.3 Poremećaj urođenog imunološkog odgovora - poveznica upale i nastanka karcinoma pluća*

Mehanizmi nastanka karcinoma pluća još uvijek su nedovoljno poznati. Većina hipoteza uzima u obzir kroničnu upalu vezanu uz kroničnu izloženost duhanskom dimu ili nekim drugim štetnim agensima kao i nakupljanje karcinogena u dišnim putovima (70). Druge hipoteze povezuju karcinom pluća s kroničnom upalom i pregradnjom pluća (71). Poznato je iz literature da poremećena regulacija aktivacije urođenog imunološkog odgovora ima važnu ulogu u nastanku i razvoju karcinoma pluća. Tako se na primjer pretpostavlja da je kronična sistemska upala, koja nastaje kao posljedica aberantnog odgovora urođenog imunološkog sustava, povezana s preinakama u plućima koje dovode do razvoja karcinoma pluća (72,73). Bitna uloga upale u razvoju karcinoma je oštećenje DNK, nedostatan popravak iste te inaktivacija tumor supresorskih gena uzrokovanih velikom proizvodnjom slobodnih radikala i sličnih spojeva nastalih od strane upalnih stanica (71). Kronična upala bilo koje etiologije, u slučaju karcinoma pluća najčešće uzrokovana izlaganjem duhanskom dimu, postavljena je kao mogući temeljni mehanizam povezivanja s karcinomom pluća i podupire Virchowljevu teoriju da se karcinom javlja na mjestima kronične upale (73). Promjene ovisne o upalnom mikrookolišu i procesima obnavljanja bitni su čimbenici za razvoj karcinoma kod pušača. Oštećenje epitelnih stanica pluća primarnim (toksične i kancerogene) i sekundarnim (upalni odgovor) noksama iz duhanskog dima, ili drugih štetnih agenasa, ima značajan utjecaj na okolno tkivo u kojem bitnu ulogu imaju tumor-infiltrirajuće imunološke stanice posebice T limfociti. Oni tijekom svog razvoja odnosno sazrijevanja mogu biti u sklopu T1 citokinskog odgovora (IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) ili T2 odgovora (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)(74). Aktivacija pojedinih podskupina T limfocita i njihova citotoksična funkcija strogo su regulirani nizom imuno-regulatornih događaja ili imunološkim kontrolnim točkama. Dosadašnja istraživanja pokazala su da su imunološke kontrolne točke, kao npr. kontrola citotoksične aktivnosti T limfocita ekspresijom PD1 receptora programirane smrti, poremećene u mnogim tumorima, pa tako i karcinomu pluća (75). Pokazalo se da u slučajevima kada Th1 „paleta“ citokina prevladava u tumorskom mikrookolišu, uz prisutnost kronične upale, utječe na povoljniji odgovor na liječenje inhibitorima kontrolnih točaka imunološkog odgovora (76). Velika istraživanja naglašavaju ulogu TLR signalnog puta u navedenim procesima i razvoju dugoročnih promjena imunološkog odgovora i smjera kojim se određena bolest razvija, te činjenicu da polimorfizmi u genima koji kodiraju za TLR imaju značajnu ulogu u promjeni

osjetljivost pojedinca na stanja u kojima je imunološki sustav nedostatan ili oslabljen (77). Signalni put programirane stanične smrti koji ide preko PD-L1/PD-1 puta aktivacije važna je komponenta imunosupresije tumora, koja sudjeluje u inhibiciji aktivacije T limfocita i povećanju imunološke tolerancije prema tumorskim stanicama (78). Stoga je izuzetno bitno razumijeti regulacijske mehanizme PD-L1/PD-1 signalnog puta u tumorskom mikrookruženju, njihovu ulogu u posredovanju procesa tzv. „bijega“ tumora od imunološkog sustava i konačno koju ulogu u tim procesima imaju TLR-i. Osim regulacije kontrolnih točaka imunološkog odgovora, važnu ulogu u procesima aktivacije imunosti imaju i egzosomi. Naime, opisano je da stanice oslobađajući egzosome mogu prenijeti signalne molekule drugim stanicama i na taj način mijenjati njihovu funkciju. Pokazalo se da egzosomi imaju značajnu ulogu u rastu tumorskih stanica, migraciji i angiogenezi, ali i u imunosupresiji (79). Tako je na primjer pokazano da aktiviranje monocita egzosomima izoliranim iz plazme ispitanika koji boluju od kronične limfocitne leukemije, preko TLR7 signalnog puta, potiče izlučivanje citokina i ekspresiju PD-L1, te polarizaciju monocita na M2 makrofage i ekspresiju PD-L1 u M2-polariziranim makrofazima. Sve to za posljedicu ima pojačani imunosupresivni učinak (80,81). Na temelju do sada provedenih istraživanja možemo zaključiti da IFN  $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, EGF i TGF- $\beta$  različitim signalnim putevima induciraju ekspresiju PD-L1 i na taj način pomažu tumoru da savlada prepreke imunološkog sustava domaćina (79). Sve navedeno ukazuje na važnu ulogu upalnog okruženja za imunološki bijeg tumora, odnosno dolazimo do zaključka da bismo moduliranjem upalnog odgovora u tumorskom mikrookolišu neposredno mogli utjecati na ishode liječenja maligne bolesti.

Kada se TLR aktiviraju i pokrene se prijenos signala unutar stanice koji u konačnici rezultira pokretanjem aktivacije kaskade transkripcijskih čimbenika, dolazi do ekspresije proupalnih gena i sinteze upalnih citokina koji sudjeluju u usmjeravanju imunološkog odgovora na antigene, stvaranju imunološkog pamćenja i reakciji na oštećenje tkiva. Navedeni procesi omogućuju obranu epitela od infektivnih čimbenika ali i ostalih noxi, posreduju u aktiviranju stečenog imunološkog odgovora pokretanjem aktivacije antigen-prezentirajućih stanica, potiču opsonizaciju molekula na leukocitima tijekom razvoja upale i doprinose učinkovitosti fagocitoze (82). Aktivacija TLR-a ima ključnu ulogu u regulaciji proliferacije stanica imunološkog sustava, privlačenju imunoloških stanica na mjesto ozljede ili infekcije, preinakama i popravcima epitelnih stanica te procesu stanične smrti (83). Prvi korak u aktivaciji urođenog imunološkog odgovora upravo je aktivacija receptora urođene imunosti, poput TLR-a, koji vežu molekule otpuštene iz patogena ili oštećenih stanica (PAMP-ovi i



DAMP-ovi), te kasnija signalizacija koja u konačnici vodi do oslobađanja nuklearnog faktora (NF)- $\kappa$ B i aktivacije ekspresije proupalnih gena. Upravljanje upalnim odgovorom i urođenom staničnom imunosti može se značajno izmijeniti promjenama u TLR signalizaciji i njihova neodgovarajuća ili neregulirana aktivacija može izazvati ozbiljne sistemske poremećaje. Zbog svoje složene i važne funkcije u regulaciji imunološkog odgovora i održavanju tkivne homeostaze, TLR signalni putevi prepoznati su kao mogući terapijski ciljevi kod mnogih upalnih i malignih bolesti (42). Uloga PPR-a u rastu i razvoju karcinoma ostaje nepoznata, točnije rečeno u literaturi se nalaze oprečni rezultati. Nekoliko studija je pokazalo povezanost razine ekspresije TLR-a u tumorskom tkivu s progresijom tumora (44,45,47). Povećana ekspresija TLR2 promovira razvoj određenih vrsta gastrointestinalnih tumora, dok je ekspresija TLR4 na epitelnim stanicama tumora jajnika povezana s porastom rasta tumora i rezistencijom na kemoterapiju (44,45). Povećana ekspresija TLR5 u tumorskom tkivu povezana je s boljom prognozom u bolesnika s tumorima nemalih stanica pluća te možemo zaključiti da TLR5 ima anti-tumorski efekt (42,45). Što se tiče uloge i povezanosti TLR7 s nastankom, razvojem i prognozama karcinoma pluća, istraživanja su pokazala da stimulacija s agonistima TLR7/TLR8 vodi do aktivacije NF- $\kappa$ B, pojačane ekspresije antiapoptotskih proteina osobito Bcl-2, pojačanog preživljenja tumorskih stanica u karcinomu pluća i kemorezistentnosti (44,48). Značajna povezanost TLR7 signalnog puta s upalom, tumorskim rastom i rezistencijom na kemoterapiju u ispitanika s karcinomom pluća govori u prilog činjenici da pojačana ekspresija TLR7 bi mogla imati značajnu ulogu u pojačanoj proliferaciji tumorskih stanica, odnosno o utjecaju TLR7 na „bijeg“ tumorskih stanica od apoptoze što predstavlja dva potencijalna modaliteta u liječenju karcinoma. Ovi podaci sugeriraju da aktivacija TLR7 signalnog puta u tumorskim stanicama može izravno doprinijeti razvoju tumora ovisno o mikrookolišu u kojem signalni put djeluje (44,48).

Istraživanja su prikazala pozitivna ali i negativna regulatorna svojstva TLR-ova u karcinogenezi, a te višestruke funkcije mogu ovisiti o odgovarajućem okruženju, vrsti stanice i specifičnim TLR-ovima (63). Osim aktivacije, poticanja upale i imunološke reakcije, smirivanje upale je također izuzetno važan proces koji se aktivira kako bi se osigurao povratak tkiva u prvobitnu homeostatsku ravnotežu. Drugim riječima, imunološki odgovor ima važnu ulogu i u održavanju homeostaze u organizmu. Tako je na primjer pokazano da aktivnost lipooksigenaza (ALOX5 i 15) na omega-3/6 ( $\omega$ -3/6) esencijalnim polinezasićenim masnim kiselinama aktivira specijalizirane posrednike za rješavanje upale (43). Disfunkcija

ovih mehanizma za smirivanje akutne upale povezana je s nastankom kroničnih upala, uslijed oštećenja tkiva ili abnormalnog remodeliranja krvnih žila (40,43).

#### 1.2.4 Uloga polimorfizma u genima za Toll-like receptore u razvoju karcinoma pluća

Raznolikost genetskog materijala, koja se zasniva na polimorfizmima, omogućuje međusobno razlikovanje pojedinaca, ali i pronalaženje gena odgovornih za nastanak patoloških stanja. Svaka promjena strukture DNK koja se odnosi na pojavu više od jedne genske inačice na istom položaju na kromosomu, uočena u više od 1% populacije, naziva se genski polimorfizam (84). Nukleotidna različitost nastaje mehanizmom pogrešne supstitucije baza (genske promjena obuhvaća samo jedan nukleotidni par), pomakom okvira čitanja (eng. *frameshift*) nastale uslijed adicije (umetanje jednog ili dva nukleotida) ili delecije (gubitak jednog ili dva nukleotida) (85). Mutacije mijenjaju redoslijed nukleotida, a promjena u jednom ili više nukleotida predstavlja točkastu mutaciju. Polimorfizmi u kojima jedan od nukleotida (A, T, G ili C) bude zamijenjen drugim nazivaju se polimorfizmi jednog nukleotida (SNP) (od eng. SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) i kao posljedica navedene promjene u strukturi DNK može doći do promjene u funkciji molekula nastalih prepisivanjem i translacijom promijenjene DNK (86). SNP-ovi se pojavljuju s učestalošću od oko 1% u populaciji, najčešći su tip varijabilnosti između dva slijeda DNK i obuhvaćaju 90% ukupnog broja varijabilnosti između dva genoma (87).

Obzirom na činjenicu da polimorfizmi mogu djelovati na ishod aktivacije različitih signalnih putova važnih za prilagodbu organizma, ta genetička raznolikost mogla bi objasniti pojedinačne razlike u urođenom imunološkom odgovoru. SNP-ovi se javljaju jednom u svakih 200 - 1000 nukleotida, prema cjelogenomskom sekvenciranju ljudskog genoma (88). Prema utjecaju na fenotip pojedinca dijele se na funkcionalne i nefunkcionalne. Funkcionalne točkaste mutacije su one koje utječu na promjene u aminokiselinskom slijedu i mogu dovesti do promjena u strukturama i funkciji proteina tj. razlike u konačnom fenotipu jedinke (89). Obično je samo između 3% i 5% svih točkastih mutacija funkcionalno (90).

Moguća uloga točkastih mutacija u TLR obitelji gena proučavana je kod različitih upalnih bolesti (sistemskog eritemskog lupusa, astme) i nekih infektivnih stanja (legioneloze, lajmske borelioze) (91,92). Pretpostavlja se s velikom vjerojatnošću da polimorfizmi u genima koji kodiraju TLR-e mogu igrati važnu ulogu u modulaciji imunološkog odgovora kod mnogih patoloških stanja jer manjkavi ili promijenjeni proteini uključeni u signalne putove mogu dovesti do neprikladnog imunološkog odgovora. Rezultati mnogih studija su pokazali da prisutnost SNP-ova u različitim regijama gena za TLR-e ima za posljedicu nastanak izmjenjenog proteina/receptora i može utjecati na sposobnost vezanja liganda na receptor i prijenos signala te rezultirati izmijenjenim međudjelovanjem signalnih i adaptornih proteina (93).

Polimorfizmi gena za TLR-e povezani su s različitim malignim bolestima. Tako su npr. SNP-ovi unutar gena za TLR2 povezani s razvojem karcinoma debelog crijeva, SNP-ovi unutar gena za TLR4 s razvojem karcinoma prostate i karcinoma želuca, SNP-ovi gena za TLR6 s razvojem ne-Hodgkinovog limfoma, a SNP-ovi gena za TLR9 s karcinomom uterusa (94). Istraživanja su pokazala da su TLR2, TLR4 i TLR9 prekomjerno eksprimirani u tkivima karcinoma pluća u usporedbi s normalnim plućnim tkivom, te da ekspresija TLR-a može ubrzati zloćudnu transformaciju epitelnih stanica, rast tumora i rezistenciju na apoptozu stanica tumora (95). Ovi rezultati idu u prilog teorije da genetske inačice TLR-a mogu utjecati na povećanje rizika za razvoj karcinoma pluća u kontekstu genetske i okolišne interakcije.

Bolest može biti posljedica pojačane ekspresije TLR-ova koji su nepotrebno aktivirani ili može biti posljedica nedovoljne TLR signalizacije što dovodi do loših obrambenih mehanizama. Otkrivanje načina na koji inačice gena odgovornih za aktivaciju i regulaciju imunološkog odgovora mijenjaju osobine imunološkog sustava mogle bi pomoći da razumijemo utjecaj koji imaju na rizik za razvoj upalnih i malignih bolesti pluća.

TLR-ovi pokreću signalne putove kojima se regulira proizvodnja citokina od strane različitih imunoloških stanica. Polimorfizmi u TLR genima mogu poremetiti tj. promijeniti ravnotežu između proupalnih i protuupalnih citokina, modulirajući rizik za razvoj infekcije, kronične upale i karcinoma. Istraživanja su pokazala da TLR polimorfizmi utječu na staničnu proizvodnju citokina i na taj način reguliraju važne imunološke funkcije koje mijenjaju tijekom upale i razvoja tumora (94). Histološkim pregledom tumorskog tkiva tj. pregledom tumorskog mikrookoliša, dokazano je da različiti citokini mogu dovesti do suprotnih ishoda u napredovanju tumora, ovisno o vrsti prisutne upale (95). Ekspresija gena koji su uključeni u navedene upalne procese, razvoj funkcionalnih razlika među stanicama i njihovo

preživljavanje regulirane su većinom putem regulacije aktivacije transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B. Prijenos signala putem TLR-a rezultira aktivacijom transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, a nepravilna kontrola aktivacije NF- $\kappa$ B može dovesti do upalnih bolesti, kao i do razvoja karcinoma (96).

Istraživanja su pokazala da postoji jasna veza između signalnog puta TLR7 i TLR8 te upale i rasta tumora, dok je za aktivaciju TLR9 dokazano da potiču urođene i antitumorske imunološke reakcije pokretanjem procesa razgradnje tumorskih stanica (48,97). Dakle, protuupalni citokini smanjuju upalu čime doprinose odstranjuju tumorskih stanica, a aktivacija proupalnih citokina pogoduje nastanku tumorskog mikrookoliša i daljnjem napredovanju tumora (98). Citokini koji potiču upalu poput tumor-nekrotizirajućeg čimbenika alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukina IL-1 $\beta$  i IL-6 direktno sudjeluju u fiziološkim, ali i patološkim odgovorima u upali i razvoju tumora, a IL-6 se smatra ključnim antiapoptotičkim i proliferacijskim čimbenikom (45,99).

Pokretanje imunološkog odgovora vezanjem PAMP-ova i DAMP-ova putem TLR-a stvara specifično okruženje koje pogoduje razvoju tumora. Tim putem transkripcijski faktori NF- $\kappa$ B, STAT3 i MAPK, koji su uključeni u usmjeravanje staničnih odgovora na raznolik niz podražaja, pokreću izražaj gena za upalne citokine. Oslobođeni citokini (poput TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6) mijenjaju sastav imunoloških stanica i imaju izravan učinak na tumorske stanice (38-40,51).

Prema nekim istraživanjima interleukin-6 (IL-6) je najznačajniji citokin u regulaciji imunološkog odgovora i njegova povećana ekspresija značajno pridonosi patogenezi upalnih bolesti i karcinoma (100). Povišena razina IL-6 detektirana je u kroničnoj upali (KOPB-u) te u tkivu karcinoma pluća u kojemu IL-6 pokreće rast i progresiju karcinoma pluća u mišjim modelima (101). Karcinom pluća s K-ras mutacijom ima zasebne intrinzične upalne karakteristike, s aktiviranim NF- $\kappa$ B signalnim putem i povišenom razinom IL-6 (101). Jedna od potencijalno ciljanih terapija karcinoma pluća je selektivno smanjenje IL-6 čime bi se usporio rast tumora (102). Karakteristični tumorski mikrookoliš stvara stresne uvjete za zdrave stanice stvaranjem hipoksije, nekroze i ozljede tkiva, a tumorske stanice vješto koriste navedene uvjete za mobilizaciju upalnih stanica i poticanje karcinogeneze (97,99).

Tumorske stanice preživljavaju stvaranjem imunosupresivnog mikrookoliša koji inhibira aktivnost citotoksičnih T i NK stanice domaćina (103). Supresorske stanice iz mijeloidne loze (MDSC) infiltriraju tumor, inhibiraju T i NK stanični odgovor i doprinose imunosupresivnom

tumorskom mikrookolišu koji štiti tumor od uništenja (104,105). Iz navedenog proizlazi da TLR7 agonisti mogu preokrenuti imunološku supresiju posredovanu mMDSC i tako mogu biti korisni dodaci imunoterapiji tumora. Antitumorski efekt je povezan i s urođenom i sa stečenom imunošću, a mikrookoliš u kojemu se tumor razvija značajno utječe na progresiju i metastaziranje tumora. Uz do sada spomenutu ulogu makrofaga, citokina, interleukina, signala za preživljenje stanica te proangiogenih faktora, značaju ulogu u tumorskom mikrookolišu imaju CD4<sup>+</sup> i C8<sup>+</sup> limfociti. TLR7 agonisti potiču nezrele dendritičke stanice na sazrijevanje (106,107).

Uloga dendritičkih stanica je izlaganje antigena na svojoj površini čime pomažu limfocitima u prepoznavanju tih antigena i potiču aktivaciju limfocita u CD8 T stanice i CD4 T pomoćne stanice, što stimulira sistemski antitumorski odgovor (106). Poznato je da CD8 T stanice, B stanice, IFN 1, IFN- $\gamma$  i plazmacitne dendritične stanice pridonose učinkovitoj supresiji tumora (107).

### 1.3 Svrha rada

Od ranije je poznata povezanost između nastanka tumora i razvoja nekontrolirane upale. Poznato je i da kronična upala mijenja mikrookoliš tumora u smjeru promoviranja nastanka i razvoja tumora. Epitelne stanice respiratornog sustava su konstantno izložene štetnim tvarima iz okoliša i zaštita respiratornog trakta ovisi o aktivaciji i regulaciji urođenog imunološkog odgovora. Važan korak u regulaciji ovih procesa je aktivacija receptora urođene imunosti (engl. *pattern recognition receptors*, PRR), a upravo su Toll-like receptori (TLR), jedni od najistraženijih PRR-a. Njihovom aktivacijom dolazi do pokretanja složenog signalnog puta koji u konačnici kulminira aktivacijom niza transkripcijskih faktora ekspresije gena koji reguliraju upalnu reakciju.

Važno je napomenuti da TLR-i nisu eksprimirani samo na stanicama imunološkog sustava, već ih eksprimiraju i mnoge neimunosne stanice, kao što su epitelne stanice i stanice fibroblasta. Konačno, davno je dokazano da i stanice tumora eksprimiraju funkcionalne TLR-e. S obzirom na njihovu kompleksnu i važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora i održavanju homeostaze tkiva, prepoznati su kao potencijalne terapijske mete u mnogim upalnim i malignim bolestima. Do danas je također objavljeno nekoliko studija koje su pokazale da je razina ekspresije nekih TLR-a na stanicama tumora povezana s progresijom tumora. Tako je npr. povećana ekspresija TLR5 povezana s boljom prognozom u pacijenata s tumorima nemalih stanica pluća, tj. da *TLR5* ima anti-tumorski efekt. Pokazano je da stimulacija s agonistima *TLR7/TLR8* vodi do aktivacije NF- $\kappa$ B, pojačane ekspresije antiapoptotskih proteina, pojačano preživljenje tumorskih stanica i smanjene osjetljivosti na kemoterapeutike. Ovi podaci sugeriraju da aktivacija TLR signalnog puta u tumorskim stanicama može izravno doprinijeti razvoju tumora.

Svrha ovog rada je ispitati postoji li povezanost genetičkih biomarkera (polimorfizama) s nastankom i razvojem karcinoma pluća. Naime, ovim istraživanjem ispitano je imaju li dosadašnji literaturni podaci koji su povezali promjenjenu ekspresiju/aktivaciju TLR7 uporište na genetičkoj razini. Također, u *in vitro* modelu ispitano je možemo li uvođenjem promjene na razini DNA detektirati funkcionalne razlike između divljeg i mutiranog tipa, prije svega u kontekstu promjene razine ekspresije gena. Sve to je ispitano/potvrđeno i na *ex vivo* modelu, gdje je na uzorcima tkiva ispitanika sa specifičnim genotipom definiran status mikrookoliša tumora, u kontekstu infiltracije stanica limfocita T. Naime, snaga ove studije leži u činjenici da smo po prvi puta uspjeli ukazati na postojanje jasnih genetičkih biljega koji mijenjaju ekspresiju gena TLR7 i koji su povezani s nastankom i razvojem karcinoma pluća.

Osim toga, svrha ove studije je rasvijetliti važnost uloge TLR7 u fiziopatologiji tumora pluća, te činjenice da bi razvoj protutumorske terapije (koji bi bio usmjeren na primjenu agonista *TLR7* kao adjuvansa) trebao uzeti u obzir ekspresiju TLR7 na stanicama tumora pluća.

## **2 HIPOTEZA**

Genetička varijabilnost promotorske regije gena TLR7 povezana je s većom učestalošću karcinoma pluća nemalih stanica, s razinom ekspresije gena u tkivima tumora, rezistencijom na kemoterapiju i kliničkim ishodom bolesti.



### **3 CILJEVI RADA**

#### **3.1 Opći cilj rada**

Opći cilj rada je bolje definiranje uloge gena TLR7 u bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica, što bi u konačnici moglo doprinijeti razvoju novih terapijskih postupaka i prognostičkih biljega.

#### **3.2 Specifični ciljevi**

1. Metodom genotipizacije odrediti učestalost odabranih polimorfni biljega TLR7 gena u definiranim skupinama (bolesnicima s NSCLC-om i zdravi ispitanici)
2. Korelirati učestalost genotipova gena TLR7 s kliničkim parametrima (TNM status i preživljenje)
3. Metodom RT-PCR ispitati razinu ekspresije gena TLR7 i *IFN $\gamma$*  u uzorcima tumorskog tkiva osoba sa specifičnim genotipom
4. Korelirati ekspresiju TLR7 s ekspresijom *IFN $\gamma$* , preživljenjem ispitanika, TNM statusom i odgovorom na terapiju
5. Profilirati tumorski mikrookoliš ispitivanjem prisutnosti CD4 i CD8 limfocita u tumorskom tkivu
6. Korelirati ekspresiju genotipa TLR7 s tumorskim mikrookolišom

## 4 MATERIJALI I METODE

### 4.1 Plan istraživanja

U ovom istraživanju za potrebe asocijacijske studije povezanosti polimorfnih biljega sa sklonošću za razvoj karcinoma pluća koristili smo uzorke prikupljene u sklopu projekta IP-06-2016/1441 „Genetički i epigenetički biomarkeri urođene imunosti u KOPB-u i karcinomu pluća“. Prikupljanje uzoraka započelo je 2017. godine nakon odobrenja Etičkog povjerenstva KBC-a Zagreb. Ovo primijenjeno, opservacijsko istraživanje prema formalnom ustroju je mješovita retrospektivna i prospektivna kohortna studija.

Istraživanje je provedeno u Klinici za plućne bolesti Jordanovac KBC-a Zagreb u suradnji s Kliničkim zavodom za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb. Molekularni dio istraživanja je proveden u Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, na Zavodu za molekularnu medicinu. Nakon utvrđivanja koji je od testiranih polimorfnih biljega povezan sa sklonošću za razvoj karcinoma pluća, analizirali smo povezanost s kliničkim parametrima (TNM status i preživljenje). U ovom dijelu istraživanja je studija prospektivna. S obzirom na to da su svi uzorci prikupljeni 2017. godine, očekivano vrijeme praćenja preživljenja, za potrebe ovog istraživanja, bilo je do 2021. godine, što je približno 5 godina za većinu ispitanika. Analiza povezanosti polimorfnih biljega s preživljenjem nije učinjena za zdrave ispitanike, s obzirom da ne raspolažemo s tim podacima i nije ih moguće pribaviti. Funkcionalna *in vitro* studija identificirane varijante gena provedena je na staničnoj liniji H1299 gdje je cilj bio ispitati kako prisutnost promotorskog polimorfizma djeluje na razinu ekspresije gena u endogenim uvjetima i uvjetima stimulacije poznatim sintetskim ligandima. Konačno, ispitali smo u uzorcima tkiva s poznatim genotipom kako je prisutnost različitih varijanti povezana s ekspresijom gena *TLR7* i *IFN $\gamma$*  i mikrookolišem tkiva tumora i na taj način po prvi puta opisali direktnu poveznicu između genetičke varijabilnosti i razine ekspresije gena *TLR7* i sklonosti za razvoj karcinoma pluća.

## 4.2 Ispitanici

Za potrebe asocijacijskih studija prikupljeno je 450 uzoraka periferne krvi ispitanika s dijagnozom karcinoma pluća nemalih stanica (engl. *Non-small cell lung cancer*) i 1283 uzoraka periferne krvi zdravih ispitanika. Uzorci ispitanika s karcinomom pluća prikupljeni su u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, u Klinici za plućne bolesti Jordanovac, a uzorci zdravih ispitanika prikupljeni su u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu. Ispitanici uključeni u ovo istraživanje potpisali su informirani pristanak i evidentirani su pod šifrom poznatom samo glavnom istraživaču čime je zajamčena anonimnost ispitanika. Za sve bolesnike primijenjeni su standardni dijagnostički kriteriji na osnovi kojih su uključeni u skupinu ispitanika s karcinomom pluća nemalih stanica. Dijagnoza karcinoma pluća provedena je nakon biopsije ili kirurškog odstranjenja lezije, te je utvrđena patohistološka dijagnoza prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije. Stadij karcinoma pluća utvrđen je TNM klasifikacijom na temelju primarnih karakteristika tumora (T), prisutnosti ili odsutnosti regionalnog zahvaćanja limfnih čvorova (N) i prisutnosti ili odsutnosti udaljenih metastaza (M). Uzorci periferne krvi (5 ml) koja je prikupljena u epruvete s antikoagulansom EDTA korišteni su za potrebe izolacije genomske DNA i pohranjeni su na  $-20^{\circ}\text{C}$  do analize. Svi uzorci krvi bolesnih i zdravih ispitanika prikupljeni su, pohranjeni i obrađeni na identičan način. Demografske karakteristike ispitanika uključenih u ovu analizu prikazane su u Tablici 2. u Rezultatima ovog rada.

Za potrebe ispitivanja razine ekspresije gena TLR7 i IFN $\gamma$  korišteni su uzorci tkiva tumora uklopljenih u parafin, parafinske kocke. Pri tome smo specifično selektirali one ispitanike/tkiva za koje nam je bio poznat genotip i dostupno tkivo dobre kvalitete. Većina uzoraka za histološku analizu je dobijena bioptičkim kliještima te je promjera do 0.5 mm te smo zbog toga imali dostupno samo 30 uzoraka s adekvatnom količinom tumorskog tkiva s zadovoljavajućom kvalitetom istog. Tkivo, odnosno histološke preparate, dobili smo od viška tkiva koje je uzeto prilikom uzimanja uzorka tkiva pri rutinskoj dijagnostičkoj obradi bolesnika u suradnji sa Kliničkim zavodom za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb. Koristili smo rezove debljine 20 mikrona. Za potrebe ove analize, iz skupine ispitanika koji su bili uključeni u analize genotipizacije, selektirali smo ispitanike za koje nam je bilo dostupno tkivo i za koje smo prethodno znali genotip, i to ukupno 60 ispitanika – podijeljenih u dvije skupine – homozigoti jednog ili homozigoti drugog genotipa. Iste uzorke (rezove porijeklom iz iste parafinske kocke) koristili smo i za potrebe ispitivanja tumorskog mikrookoliša, po 15

uzoraka iz svake skupine. Kliničke karakteristike ispitanika uključenih u ove analize također su prikazane u Rezultatima ovog rada.

#### **4.3 Izolacija genomske DNA iz stanica periferne krvi metodom isoljavanja**

Za potrebe analize genotipizacije, genomska DNA izolirana je iz pune krvi metodom isoljavanja. Ukratko, miješanjem krvi s puferom za lizu eritrocita (osmotska liza stanica) uklonjeni su eritrociti iz uzorka. Krv smo otopili na sobnoj temperaturi, jednom volumenu krvi dodali smo trostruki volumen pufera za lizu eritrocita (engl. Red Cell Lysis Buffer, RCLB). Uzorak su centrifugirali a dobiveni nadtalog, s ostacima liziranih eritocita, dekantirali. Leukocite smo razgradili djelovanjem jakog deterdženta na površinsku napetost stanica. Iz nastalog staničnog lizata djelovanjem visoko-koncentrirane otopine soli (isoljavanjem) istaložili smo proteine i oslobodili genomsku DNA. Na isprani talog smo dodali pufer SE, otopinu SDS-a (natrijev laurilsulfat) i proteinazu K. Dobiveni talog je inkubiran smo preko noći na 37°C u vodenoj kupelji. Nakon inkubacije, iz smjese smo istaložili proteine djelovanjem 5M otopine NaCl. Smjesu smo centrifugirali, a dobiveni pročišćeni nadtalog pomiješali s istim volumenom 2-propanola. Istaloženu DNA smo staklenom kukicom prenijeti u ledeni 70% etanol. Tako ispranu DNA prenijeli smo u TE pufer i pohranili na +4°C, do korištenja za analizu genotipizacije metodom lančane reakcije polimerazom.

#### **4.4 Odabir polimorfnih biljega iz NCBI baza podataka**

Odabir polimorfnih biljega uključenih u analizu genotipizacije napravljen je pomoću baze podataka koja sadrži popis polimorfizama unutar funkcionalno značajnih regija gena. Kriteriji odabira polimorfnih biljega koji će biti uključeni u analizu bili su učestalost u općoj populaciji (preko 1%) i smještaj u promotorskoj regiji gena, obzirom na potencijalni učinak na ekspresiju gena od interesa. Za ovo istraživanje izabrali smo polimorfne biljege gena *TLR7* koji su smješteni u promotorskoj regiji gena (*TLR7* rs593543 6 CT i *TLR7* rs12843803 TG). Koristili smo se National Center for Biotechnology Information (NCBI) bazom podataka dostupnom na PubMed.

#### **4.5 Lančana reakcija polimeraze primjenom specifičnih TaqMan proba**

PCR je metoda umnažanja ciljanog odsječka DNA u uvjetima *in vitro*, pomoću termostabilnog enzima, Taq-DNA polimeraze, i dvije konstruirane oligonukleotidne

početnice. Reakcija se odvija u tri koraka: 1. proces denaturacije kalupa DNA, 2. sparivanje početnica (engl. annealing) i 3. sinteza komplementarnih lanaca DNA. TaqMan probe su jedan od primjera tzv. hidrolizirajućih proba koje koriste 5'-3' egzonukleaznu aktivnost enzima Taq polimeraze, što omogućava cijepanje dvostruko obilježene komplementarne probe prethodno vezane za kalup DNA. Hibridizirajuća proba je oligonukleotidini odsječak visoko komplementaran kalupu DNA i obilježen fluorescencijskom probom (engl. *reporter*) i prigušujućom probom (engl. *quencher*). One se nalaze na suprotnim krajevima probe i kad su u međusobnoj blizini, blizina prigušivača onemogućava fluorescenciju reporterske boje. Egzonukleazna aktivnost polimeraze omogućava razdvajanje fluorescencijske i prigušujuće probe i samim tim praćenje akumulacije produkta i vizualizaciju reakcije PCR u stvarnom vremenu. U ovom radu lančana reakcija polimeraze specifičnim TaqMan probama korištena je u svrhu genotipizacije uzoraka metodom alelna diskriminacije i određivanja razine ekspresije ciljanih gena. Genotipizacija uzoraka korištenjem TaqMan proba, alelna diskriminacija, omogućava istovremeno umnažanje specifičnih alela metodom lančane reakcije polimeraze i njihovu detekciju. Kod genotipizacije uzoraka DNA u ovom istraživanju, u reakcijsku smjesu unijeli smo obilježene probe koje su specifične za oba alela koja ćemo testirati na određenom lokusu. U ovom radu analizirali smo tzv. točkaste polimorfizme SNP-ove. Polazi se od pretpostavke da uzorak genomske DNA svakog ispitanika može biti ili heterozigot, ili jedan odnosno drugi homozigot. Komercijalno dostupni esaji su dizajnirani tako da sadrže specifične početnice za odsječak DNA od interesa i visoko komplementarne probe za jedan i drugi alel. Ukoliko je uzorak ispitanika homozigot, tada će analiza alelna diskriminacije pokazati da je, u krajnjem očitavanju ukupne fluorescencije na kraju reakcije PCR (engl. end-point analysis), instrument očitao samo fluorescenciju karakterističnu za taj alel. U slučaju kada je ispitanik heterozigot, krajnja analiza očitat će razinu fluorescencije specifične za oba alela. Za određivanje razine ekspresije gena *TLR7* i *IFN $\gamma$*  korištena je komparativna CT metoda metoda kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu (eng. *real-time quantitative PCR*, RT-qPCR) sa specifičnim hidrolizirajućim, TaqMan, probama, prema uputi proizvođača (Thermo, SAD). Komparativna CT metoda ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ,  $\Delta\Delta CT$ ) je najčešća metoda analize podataka kod relativne kvantifikacije produkata. Ova metoda podrazumijeva korištenje ciljanih gena i endogene kontrole. U procesu kvantifikacije, najprije se gen od interesa (GOI), tj. njegova CT vrijednost, normalizira u odnosu na endogenu kontrolu (EK) u istom uzorku (npr. zdravo tkivo ispitanika) čime se dobiva  $\Delta CT$  vrijednost. Dobivena  $\Delta CT$  vrijednosti za uzorak se zatim uspoređuju sa  $\Delta CT$  vrijednostima kalibratora (npr. tumorsko tkivo ispitanika) te se tako dobije  $-\Delta\Delta CT$  vrijednost. Zatim se  $-\Delta\Delta CT$  vrijednost uvrsti u jednadžbu (omjer

količine gena od interesa =  $2 - \Delta\Delta\text{CT}$ ) kako bi se dobio omjer normalizirane količine gena od interesa u uzorku u odnosu na normaliziranu količinu gena od interesa u kalibratoru. Broj 2 je zapravo efikasnost umnažanja. Pošto ova metoda podrazumijeva da je umnažanje svih gena jednako ili slično može se uvrstiti vrijednost 2 kao efikasnost umnažanja, što bi značilo da se iz jedne molekule kalupa nakon jednog PCR ciklusa dobiju dvije molekule. U našem slučaju koristila su se tumorska tkiva ispitanika s definiranim genotipom na lokusu rs593543.

#### **4.6 Izolacija RNA iz parafinskih kocki**

U svrhu ispitivanja razine ekspresije gena *TLR7* i *IFN $\gamma$*  u tkivima tumora, RNA je izolirana iz tkivnih rezova pomoću komercijalno dostupnog kompleta Rneasy (Qiagen, SAD), prema uputi proizvođača. Ukratko, nakon potvrde patologa da je tumorsko tkivo adekvatno, parafinska kocka s uklopljenim tkivom tumora narezana je na ploške debljine 20  $\mu\text{m}$  (2-3 komada) koje su pomiješane s deparafinizacijskom otopinom i inkubirane na 56°C, 3 minute. Nakon tretmana proteinazom K i Dnazom uzorak se prenio na kolonicu, višekratno isprao, a kolonica se finalno isprala s 30  $\mu\text{l}$  Rnaza-slobodne vode. Na taj način je izolirana RNA bila sahrana sa kolonice i spuštena zajedno s eluatom u tubicu.

#### **4.7 Priprema komplementarne DNA (cDNA)**

Izolirana RNA se metodom reverzne transkripcije prevela u cDNA, uz primjenu komercijalno dostupnih kompleta. Ukratko, nakon izolacije ukupne RNA odstranjena je genomska DNA koja zna zaostati za vrijeme izolacije. Za DNazni tretman je korišten komercijalno dostupan kit TURBO DNA-*free*<sup>TM</sup> Kit (Invitrogen, SAD). Za DNazni tretman uzeto je 10  $\mu\text{g}$  ukupne RNA. Tako pripremljena RNA je zatim prevedena u cDNA komercijalnim kitom High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, SAD), prema uputi proizvođača. Za reakcijsku smjesu reverzne transkripcije koristili smo 1  $\mu\text{g}$  RNA.

#### **4.8 Priprema plazmidnog konstrukta i mutageneza**

Plazmid s divljim tipom promotorske regije gena *TLR7* ukloniran u pGL3 plazmid (hTLR7pt2) je dobiven od dr.sc. Alexandera Webera, sa Sveučilišta u Tübingenu, Njemačka. Kako bi mogli usporediti promotorsku aktivnost divljeg tipa i identificirane mutirane varijante (rs5935436), napravljena je ciljana mutageneza s ciljem dobijanja plazmida koji nosi

odabranu mutaciju u promotorskoj regiji gena *TLR7*. Za potrebe mutageneze korišten je reakcijski komplet LongRange PCR Kit (QIAGEN, Njemačka), prema uputama proizvođača. Ukratko, u reakcijskoj smjesi za kružnu mutagenezu, prema uputi proizvođača, korištene su početnice prikazane u Tablici 1. Za reakciju je korišten PCR uređaj, Biometra (Analytik Jena, Njemačka) prema programu dostupnom u uputi proizvođača.

**Tablica 1.** Nukleotidni slijed početnica korištenih za mutagenezu hTLR7pt2 plazmida

<b>Početnica 1 (F1)</b>	5'- GAAGCACATATAGCTTAGCCTCCAGAGACACAGAAC -3'
<b>Početnica 2 (R1)</b>	5'- GTTCTGTGTCTCTGGAGGCTAAGCTATATGTCGTTTC -3'

Kako bi odstranili početni kalup (hTLR7pt2 sa divljim tipom promotorske regije) reakcijska smjesa je tretirana s *DpnI* enzimom koji razgrađuje metiliranu DNA, dok je nemetilirana DNA intaktna. S obzirom na to da je početni kalup/plazmid umoženo pomoću bakterija koje tijekom replikacije metiliraju molekule DNA, biti će degradiran djelovanjem enzima *DpnI*. Novonastali plazmid, tijekom mutageneze, odnosno PCR reakcije, je nemetilirani, pa tako ostaje nerazgrađen. Nakon razgradnje enzimom *DpnI*, 1  $\mu$ L smjese je pomiješan sa komercijalno dostupnim kompetentnim DH5 $\alpha$  *Escherichia coli* stanicama, te je smjesa stavljena u ohlađenu kivetu za elektroporaciju i pokrenut je program elektroporacije bakterija pomoću *GenePulser Cell* elektroporatora (Bio-Rad, SAD). Nakon elektroporacije bakterije su inkubirane u 1 mL Luria-Bertani (LB) tekućeg medija na 37 °C, uz trešnju. Nakon inkubacije 200  $\mu$ L bakterija je nasadeno na LB ploče koje sadrže 0,8 % agar i ampicilin (pGL3 vektor sadrži gen za rezistenciju na ampicilin) i inkubirano preko noći na 37 °C. Sljedeći dan pojedinačne kolonije su prenešene u 2 mL tekućeg medija sa ampicilinom, te su uzgajane preko noći. 1,5 mL prekonodne bakterijekse kulture se prebaci u tubicu te se centrifugira 3 min na 8 000 rpm. Odlje se supernatant, te se talog resuspendira u 200  $\mu$ L otopine P1 (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/mL RNase A). Zatim se doda 200  $\mu$ L otopine P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), tubica se okrene 4-6 puta, te se inkubira do 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije dodaje se 200  $\mu$ L otopine P3 (3.0 M kalijev acetat, pH 5.5), tubica se okrene 4-6 puta i centrifugira se 10 min na +4°C pri 12 000 g. Nakon centrifugiranja supernatant se prebaci u novu tubicu i doda se 450  $\mu$ L izopropanola, smjesa se promiješa i centrifugira 20 min na +4°C pri 12 000 g. Nakon centrifugiranja makne se

supernatant i doda se 500  $\mu\text{L}$  70% eatanol. Smjesa se centrifugira 10 min na  $+4^\circ\text{C}$  pri 12 000 g. Odstrani se supernatant i talog se osuši. Kada se talog osuši otopi se u 40  $\mu\text{L}$  redestilirane vode.

Za provjeru uspješnosti mutagenoze izolirani plazmidi iz pojedinačnih kultura analizirani su metodom sekvencioniranja po Sangeru, koristeći komercijalno dostupan servis (Macrogen, Europa Servis).

#### **4.9 Uzgoj staničnih kultura**

U ovom radu korištena je stanična linija humanih epitelnih metastatskih stanica nemalnih stanica karcinoma pluća, H1299 (ATCC® CRL-5803™). Stanice su uzgajane u tekućem hranjivom mediju DMEM (*eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma Aldrich, Njemačka) obogaćenom s 10%-tnim fetalnim serumom goveda (*eng. fetal bovine serum*, FBS). Stanice u mediju uzgajane su u plastičnim posudicama u inkubatoru na  $37^\circ\text{C}$  u vlažnoj atmosferi s 5%-tnim udiom  $\text{CO}_2$ .

#### **4.10 Prolazna transfekcija stanica**

Kako bi se usporedio utjecaj SNP-a na aktivnost promotora, H1299 stanice transficirane su s pGL3 plazmidom koji ispred gena za luciferazu sadrži divlji tip promotorske regije *TLR7* gena, odnosno mutiranu verziju. Na pločicu s 24 jažice, nasadeno je 100 000 H1299 stanica po jažici u 500  $\mu\text{L}$  DMEM medija. Sljedeći dan dodana je transfekcijska smjesa. Transfekcijska smjesa po jažici sadržavala je 500 ng hTLR7pt2, odnosno 500 ng hTLR7pt2 T, te 50 ng pGL3 renilla plazmida u 25  $\mu\text{L}$  Opti-MEM (Thermo Fischer, SAD) medija. Također je pripremljeno 25  $\mu\text{L}$  otopine lipofectamina 2000 (Thermo Fischer, SAD) koja je sadržavala 2.5  $\mu\text{L}$  lipofectamina i 22.5  $\mu\text{L}$  Opti-MEM-a. Lipofektamin i plazmidi su pomješani te je smjesa ostavljena 15 min na sobnoj temperaturi nakon čega je 50  $\mu\text{L}$  smjese dodano na stanice po jažici. Nakon 4 sata inkubacije uklonjen je medij s transfekcijskom smjesom i dodano je 500  $\mu\text{L}$  medij (DMEM), medij sa lipopolisaharidom (LPS, 0.1, 1 i 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) i medij sa CpG (ODN M326), (1, 5 i 10  $\mu\text{M}$ ).

#### **4.11 Dual-glo Luciferazni test**

U ovom radu korišten je dual-glo reporterski test u svrhu određivanja funkcionalnog značaja identificiranog polimorfizma u promotorskoj regiji gena *TLR7*. Ovaj reporterski sustav koristi konstrukte s ugrađenim genom za luciferazu pod različitim promotorima. U



našem slučaju koristili smo konstrukt koji je bio pod kontrolom humanog TLR7 promotora. Analiza se temelji na tome da ukoliko dođe do promjene oslobođene svjetlosti, tj. bioluminiscencije u eksperimentalnom uzorku, u odnosu na kontrolu, zaključujemo da je došlo i do promjene aktivnosti promotora. Za potrebe normalizacije rezultata u test se uvodi i kontrolni reporterski sustav koji nam je omogućio da „poravnamo“ djelovanje globalnih eksperimentalnih utjecaja, kao što su smrt stanice, inhibicija rasta stanice, neujednačenost broja nasađenih stanica i slično. U ovom radu korišten je Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, SAD), komercijalni komplet koji se sastoji od dva različita supstrata za enzime *firefly* luciferazu i *renilla* luciferazu. Dodavanjem supstrata navedenim enzimima oslobađa se svjetlost koja se mjeri luminometrom. U našim pokusima korišten je komercijalno dostupan kontrolni plazmid pRL-TK s ugrađenim genom za *renilla* luciferazu pod promotorom gena timidin kinazu virusa herpes simpleks (HSV) (poklon prof. dr. Alexandra Webera, DKFZ, Heidelberg, Njemačka). U ovom radu korišten je luciferazni test u svrhu ispitivanja utjecaja identificirane varijante na razinu ekspresije gena TLR7. Korišten je ranije pripremljen konstrukt (poklon prof. dr. sc. Alexandra Webera, DKFZ, Heidelberg, Njemačka) u kojem je gen za *firefly* luciferazu smješten ispred promotorske regije gena TLR7 i mjerena je aktivacija gena bez stimulacije i u uvjetima stimulacije. Ukratko, stanice H1299 bile su nasađene u plastične mikrotitarske pločice s 96 bunarića. Nakon 24 sata istovremeno su transfecirane s reporterskim konstruktom i kontrolnim, *renilla* luciferaza konstruktom. Četrdeset osam sati nakon transfekcije stanice su stimulirane specifičnim ligandima. Dvadeset četiri sata nakon stimulacije sa stanica je uklonjen medij, te je pločica ostavljena na -80 °C preko noći. Sljedeći dan dodano je 160 µL pasivnog pufera za lizu stanica (Promega, SAD), a oslobođena luminescencija mjerila se na luminoetru (Fluoroskan ascent FL, Thermo, Finska). Po 50 µL po uvjetu odpipetirano je u bijele komercijalno dostupne pločice za očitavanje luminescencije (Greiner, Njemačka). U smjesu je dodano 50 µL supstrata S1 (Promega, SAD) za *firefly* luciferazu. Nakon inkubacije od 25 minuta na sobnoj temperaturi izmjerena je luminescencija. Nakon toga je dodano 50 µL supstrata S2 (Promega, SAD) za *renilla* luciferazu (razrjeđen 1:100), te je pri istim uvjetima inkubacije izmjerena luminescencija. Rezultati mjerenja izraženi su kao omjeri očitanih bioluminiscencija (*firefly/renilla*) i na taj način dobivena je vrijednost aktivnosti luciferaze za analizirane stanice.

#### **4.12 Imunohistokemijsko bojanje preparata monoklonskim protutijelima i analiza dobivenih rezultata**

Imunohistokemija je metoda kojom se određivanje specifičnih antigena u tkivu vrši s pomoću ciljno usmjerenih protutijela (određeno protutijelo se veže samo za ciljni antigen). Imunohistokemija nam daje informacije o određenim staničnim markerima koji definiraju specifični fenotip te na taj način upotpunjuje morfološku analizu tkiva. Metoda se koristi u dijagnostičke i istraživačke svrhe da bi se utvrdila distribucija molekula koje želimo proučavati. Monoklonska protutijela reagiraju s jednim, a poliklonska s više epitopa na molekuli antigena. Antigeni u tkivu se mogu imunohistokemijski detektirati na dva načina, direktnom ili indirektnom metodom. U ovom radu imunohistokemijska analiza korištena je u svrhu ispitivanja stupnja infiltracije CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> stanica limfocita u tkivima tumora, tj. profiliranja tumorskog mikrookoliša. Parafinski rezovi tumorskog tkiva debljine 4-5 µm obrađeni su u Zavodu za patologiju Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu, u sklopu rutinske analize uzoraka.

Dobiveni uzorci karcinoma obrađeni su standardnom histološkom metodom koja uključuje 24 satnu fiksaciju u 10%-tnom puferiranom formalinu te dehidraciju u etanolu rastućih koncentracija (70%, 80%, 96% i 100%). Tkivo je potom provedeno kroz ksilol te prožeto u tekućem parafinu na temperaturi od +60, nakon čega je uklopljeno u parafinske blokove. Tako uklopljeno tkivo bilo je ohlađeno na +4, te je bilo rezano na kliznom mikrotomu na rezove debljine 4-5 µm. Ovi su rezovi nakon deparafiniranja u ksilolu i dehidracije u opadajućem nizu koncentracije etanola (100%, 96%, 80% i 70%) bili obojani histokemijskom tehnikom na hemalaun-eozin (HE). Na hemalaun-eozinskim (HE) preparatima ponovno je procijenjena morfološka građa tumorskog tkiva te se potvrdio karcinom pluća. Nakon toga je odabran reprezentativni parafinski blok za rezanje za daljnja imunohistokemijska bojanja.

Parafinski rezovi tumorskog tkiva debljine 4-5 µm bili su podvrgnuti procesu deparafiniranja ksilenom i rehidracije u padajućem nizu koncentracija etanola, a potom su isti preparati bituronjeni 2 minute u metanol. Nakon ispiranja u fiziološkoj otopini puferiranoj s fosfatnim puferom, pH 7,2 (engl. phosphate buffered saline, PBS) endogena peroksidazna aktivnost bila je blokirana s 3%-tnim vodikovim peroksidom. Slijedi tretiranje u mikrovalnoj pećici 3 puta po 5 minuta u puferu, pH 9 (Dako Retrieval Solution), a potom hlađenje na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. Nakon toga rezovi su inkubirani primarnim monoklonskim mišjim anti-humanim CD8 protutijelom (Monoclonal mouse anti-human, clone C8/144B, DAKO, Danska) u razrjeđenju od 1:50 uz dodatak peroksida te ispiranja

pufferom. Nakon toga je dodano sekundarno protutijelo EnVision (K8000, DAKO, Danska) i inkubirano na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon ispiranja sekundarnog protutijela u pufferu, dodao se diaminobenzidin (DAB, DAKO) koji je kod reakcije antigen-antitijelo prikazalo kao smeđe nuklearno obojenje. Suvišak DAB-a ispirao se destiliranom vodom. Tkivo je kontrastirano hematoksilinom. Uz svako bojanje izrađuje se pozitivna kontrola koja je bila serozni karcinom jajnika. Pozitivnom reakcijom su se smatrale stanice čije su jezgre obojane smeđom bojom. Za imunohistokemijsko bojanje primarnim monoklonskim protutijelom anti-CD8 razrijeđeno u omjeru 1:10 u BSA (engl. bovine serum albumin) koncentracije 1 mg/mL korišten je EnVision kit (K8000, DAKO). CD8+ proteinski konjugati prisutni u stanicama prikazani su diaminobenzidinom (DAB, DAKO) kao smeđe nuklearno obojenje i kontrastirani s hematoksilinom (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Uz svako bojanje izrađuje se pozitivna i negativna kontrola.

#### 4.13 Statistička analiza podataka

U svrhu istraživanja parova, slučajeva i kontrola (od engl. *case-control study*), tj. ispitivanja povezanosti genotipova i rizika od razvoja karcinoma pluća koristili smo se logističkom regresijom i testirali smo distribuciju (raspodijelu) odabranih polimorfni biljega, SNP-ova, unutar definiranih skupina. Kako bi se pronašla statistički značajna razlika, usporedili smo distribuciju frekvencije određenog polimorfizma među dvije odabrane skupine i oni polimorfizmi kod kojih je je p vrijednost distribucije alela bila  $<0,05$  smatrali su se statistički značajnim. Mjera učinka testiranog SNP-a na karcinom pluća nemalih stanica izražena je pomoću omjera izgleda (od engl. odds ratio, OR), dok je 95% interval pouzdanosti (95% CI) izračunat pomoću Woolfove metode. Distribuciju genotipova jednog bialelnog polimorfizma u skupini slučajeva i kontrola zbirno smo prikazali u  $2 \times 3$  tablici kontingencije. Konstruirali smo regresijski model kako bi se utvrdila povezanost između izdvojenih polimorfizama i kategoriziranih skupina. Ishod ili zavisnu varijablu predstavlja pripadnost skupini dok nezavisnu ili eksplanatornu varijablu predstavlja kombinacija alela (AA, AB, BB). Za procjenu utjecaja kliničkih parametara na ukupno preživljenje koristili smo krivulje preživljenja pomoću Kaplan-Meierove metode i usporedili log-rank testom. Analiza razlike u ekspresiji gena TLR7 i IFN $\gamma$  između tkiva tumora koja nose definirani genotip TLR7 načinjena je Pearsonovom korelacijom. Statistički značajnom smatrana je vrijednost empirijske razine značajnosti  $p \leq 0.05$ . Kod usporedbe dvije grupe podataka koristili smo MannWhitney U test, a kod usporedbe tri ili više skupina podataka neparametrijsku Kruskal-

Wallisov test ANOVA rangova. U analizi se koristila licencirana programska podrška MedCalc Statistical Software version 19.4.0 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020). Podaci su prikazani tablično i grafički. Priprema podataka izvršena je pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel.

## 5 REZULTATI

### 5.1 Rezultati analize općih karakteristika ispitanika

U ovom dijelu istraživanja opisane su karakteristike studijske populacije tj. bolesnika s karcinomom pluća (dob, spol, pušački status i forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1)) u usporedbi s kontrolnom skupinom odnosno zdravom populacijom. Kod bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica utvrđena je patohistološka dijagnoza i stadij karcinoma i kategorizirana je prema TNM kriterijima. Navedene karakteristike su ispitane s ciljem utvrđivanja njihove učestalosti i raspodjele među definiranim skupinama.

U svrhu istraživanja genetičke povezanosti odabranih polimorfni biljega s rizikom za razvoj karcinoma pluća nemalih stanica, uključeno je ukupno 1750 ispitanika, podijeljenih u dvije skupine: bolesnici s karcinom pluća (N=467) i kontrolna skupina zdravih ispitanika (N=1283) (Tablica 2). Iako je muški spol zastupljeniji u svim skupinama istraživane populacije, u skupini koja je imala samo karcinom pluća bez dijagnosticiranog KOPB-a bilo je značajno više žena u odnosu na ostale dvije skupine. Očekivano je veći udio pušača i bivših pušača u skupinama bolesnika s KOPB-om s obzirom na to da je pušenje osnovni uzrok KOPB-a.

**Tablica 2.** Prikaz demografskih karakteristika ispitanika uključenih u asocijacijske studije prema dobi, spolu, pušačkom statusu i plućnoj funkciji.

<b>OPĆE KARAKTERISTIKE</b>	<b>KP</b>	<b>KONTROLNA SKUPINA - ZDRAVI</b>
Broj (N)	467	1283 (100.00%)
Dob, godine, medijan (min; max)	63 (33; 87)	38.01 (16,38; 66,16)
Nema podataka	1	15
<b>Spol (N)</b>		
Muškarci	309	1116
Žene	158	163
Nema podataka	0	4
<b>Pušački status (N)</b>		
Aktivni pušač	205	325
Bivši pušač	194	3
Nepušač	56	954
Nema podataka	12	1

FEV1 (N)		
FEV1 80-120	215	*
FEV1 50-80	157	*
FEV1 30-50	36	*
FEV1 ≤ 30	5	*
Nema podataka	54	*

**KP** – ispitanici s dijagnozom karcinoma pluća  
**FEV1**- forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi izdisaja  
 „\*„ - nije analizirano

U svrhu istraživanja razine ekspresije gena TLR7 i IFN $\gamma$  i ispitivanja tumorskog mikrookoliša uključeno je ukupno 60 ispitanika, tj. tkiva ispitanika s dijagnosticiranim karcinomom pluća nemalih stanica uklopljenih u parafin. Korelacija kliničke/patohistološke TNM klasifikacije proširenosti bolesti s genotipizacijom tkiva ispitanika koji su uključeni u studiju, nakon provjere kvalitete tkiva, prikazane su u tablici 3.

**Tablica 3.** Prikaz kliničke/patohistološke TNM klasifikacije (tkiva) uključenih u analizu razine ekspresije gena i analizu profiliranja tumorskog mikrookoliša.

GENOTIP	C/C	T/T
<b>N (broj uzoraka)</b>	31	17
<b>T (TNM status)</b>		
1	8	5
2	12	5
3	6	5
4	5	2
<b>N (TNM status)</b>		
0	17	10
1	7	1
2	7	6
<b>M (TNM status)</b>		
0	27	15
1	4	2
<b>STADIJ BOLESTI</b>		
1	5	5
2	14	3
3	8	7
4	4	2

TNM- tumor,nodus,metastaza

## 5.2 Rezultati analize odabira polimorfnih biljega

Pretraživanjem baze podataka i dostupne literature, za potrebe ovog istraživanja, odabrali smo dva polimorfna biljega smještena u promotorskoj regiji gena *TLR7*: rs5935436 CT i rs12843803 TG. Tablica 4. prikazuje nazive odabranih polimorfni biljega s obzirom na njihovu poziciju u genomu, učestalost manje zastupljenog alela (MAF, od engl. minor allele frequency) i opis promjene na razini nukleotida. Kao što je vidljivo iz Tablice 4., zastupljenost MAF-a za polimorfizam rs5935436 iznosi 0,1 dok je za polimorfizam rs12843803 zastupljenost 0,26.

**Tablica 4.** Smještaj i učestalost odabranih polimorfni biljega.

NAZIV	POZICIJA	PROMJENA	MAF
rs5935436	- 1300 (promotor)	C>T	0,1
rs12843803	- 8873 (promotor)	T>G	0,26

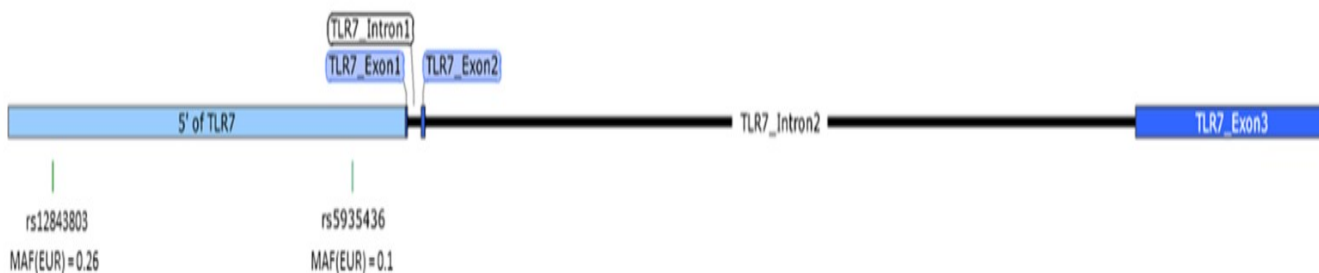
MAF- učestalost manje zastupljenog alela od engl. *Minor Allele Frequency*

C- citozin

T - timin

Gen za *TLR7* smješten je na X. kromosomu, a testirani polimorni biljezi rs5935436 i rs12843803 smješteni su u promotorskoj regiji gena. Polimorfizam rs5935436 karakterizira promjena nukleotida C u nukleotid T, a polimorfizam rs12843803 je karakterističan zbog promjene nukleotida T u G. S obzirom na smještaj u promotorskoj, nekodirajućoj regiji, ne dolazi do promjena u slijedu aminokiselina. Smještaj odabranih polimorfni biljega u promotorskoj regiji gena *TLR7* prikazan je na slici 4.

**Slika 4.** Smještaj odabranih polimorfni biljega u promotorskoj regiji gena u odnosu na gen *TLR7*.



### 5.3 Učinak testiranih SNP-ova na sklonost za razvoj karcinoma pluća nemalih stanica

Cilj ovih analiza bio je ispitati povezanost odabranih SNP-ova s nastankom karcinoma pluća nemalih stanica. Ispitivana je učestalost raspodjele polimorfnih biljega između dvije skupine ispitanika: ispitanici s dijagnosticiranim karcinomom pluća nemalih stanica (slučajevi; od engl. cases) i zdrava skupina ispitanika (kontrola). Cilj je bio istražiti povezanost raspodjele genotipova u navedenim skupinama ispitanika i na taj način ispitati postoji li povezanost specifičnog genotipa sa sklonošću za razvoj karcinoma pluća. Za potrebe ovih analiza koristili smo dvije skupine ispitanika – ispitanike s dijagnozom karcinoma pluća (neovisno o KOPB statusu) i zdrave ispitanike. U svrhu analize određena je mjera učinka u obliku omjera izgleda i intervala pouzdanosti.

Uspoređivana je distribucija frekvencije alela odabranih polimorfizama među definiranim skupinama, a za daljnje funkcionalne analize odabran je onaj polimorfizam čija se distribucija alela statistički značajno razlikovala među skupinama ( $p < 0,05$ ). Modelom logističke regresije utvrđena je povezanost između odabranog polimorfizama i kategoriziranih skupina. Ishod ili zavisnu varijablu predstavlja pripadnost skupini dok nezavisnu ili eksplanatornu varijablu predstavljaju kombinacije alela (AA, AB, BB). Mjeru učinka tog SNP-a na rizik za razvoj karcinoma pluća izražena je pomoću omjera izgleda (eng. OR, *Odds Ratio*).

#### 5.3.1 Rezultati analize povezanosti polimorfizma rs5935436 CT s rizikom za razvoj karcinoma pluća

Cilj ove analize bio je ispitati postoji li povezanost između povećanog rizika za razvoj karcinoma pluća među nositeljima određenog genotipa za polimorfizam rs5935436 CT. U ovu analizu uključeni su ispitanici koji su imali dijagnosticiran karcinom pluća nemalih stanica (KP) i zdravi ispitanici kao kontrola. Rezultati ove analize prikazani su u Tablici 5. Kada je uspoređivana učestalost alela testiranog SNP-a između testiranih skupina, bez prilagodbe na dob, spol i status pušenja, utvrđena je statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova. Za testirani polimorfizam je otkriveno da je prisutnost manje zastupljenog alela povezana s povećanim rizikom za razvoj karcinoma pluća (C/T + T/T; OR = 1,48 [1,09-2,01];  $p=0,0122$ ). Rezultati ove analize pokazali su da prisutnost mutiranog alela daje veći izgled da će osobe koje ga nose oboljeti od KP-a. Raspodjela heterozigotnog alela (C/T) statistički je značajna kod ispitanika s karcinomom pluća (C/T; OR=2,7 [1.62-4.5];  $p=0,0001$ ). Također, ukupna prisutnost mutiranog alela (C/T+T/T) statistički je značajno povezana sa sklonošću za razvoj karcinoma pluća ( $p=0,0122$ ).



**Tablica 5.** Povezanost genotipa SNP-a rs5935436 CT sa KP-om iskazan kao omjer izgleda (OR) i 95% interval pouzdanosti (95% CI), neovisno o spolu, dobi i pušačkom statusu.

Genotip	KP / ZDRAVI		OR (95% CI)	P
	KP	Zdravi		
C/C	377 (83,8%)	1084 (88,4%)	1	
C/T	30 (6,7%)	32 (2,6%)	2,7 (1,62 - 4,5)	<b>0,0001</b>
T/T	43 (9,5%)	110 (9%)	1,12 (0,77 - 1,63)	0,5374
C/T + T/T	73 (16,2%)	142 (11,6%)	1,48 (1,09 - 2,01)	<b>0,0122</b>

KP- karcinom pluća  
C- citozin  
T - timin

### 5.3.2 Rezultati analize povezanosti polimorfizma rs12843803 TG s rizikom za razvoj karcinoma pluća

Cilj ove analize bio je ispitati postoji li značajna povezanost povećanog rizika za razvoj karcinoma pluća među nositeljima određenog genotipa za polimorfizam rs12843803\_TG. U ovu analizu također su bili uključeni ispitanici koji su imali dijagnosticiran karcinom pluća (KP) i zdravi ispitanici koji su služili kao kontrola. Kada je uspoređivana učestalost alela testiranog SNP-a između bolesnika s karcinomom pluća i kontrolne zdrave skupine, utvrđena je statistički značajna razlika u raspodjeli heterozigotnog alela (T/G OR = 2,38 [1,62-3,52] P< 0,0001). Rezultati ove analize prikazani su u Tablici 6.

**Tablica 6.** Povezanost genotipa SNP-a rs12843803 TG s KP-om iskazana kao omjer izgleda (OR) uz 95% interval pouzdanosti (95% CI), neovisno o spolu, dobi i pušačkom statusu

KP / ZDRAVI				
TLR7 rs12843803 TG				
Genotip	KP	Zdravi	OR (95% CI)	P
T/T	315 (71%)	879 (72 %)	1	
T/G	53 (12 %)	62 (5 %)	2,38(1,62 - 3,52)	<b>&lt;0,0001</b>
G/G	77 (17 %)	284 (23 %)	0,76 (0,57 - 1,00)	0,0532
T/G+ G/G	130 (29 %)	346 (28 %)	1,05 (0,82 - 1,33)	0,6983

KP- karcinom pluća  
C- citozin  
T - timin

### 5.3.3 Rezultati analize povezanosti testiranih polimorfnih biljega s kliničkim parametrima – status TNM, stadij bolesti i preživljenje

Cilj ovih analiza bio je ispitati kako je prisutnost odabranih polimorfni biljega povezana s kliničkim parametrima ispitanika s dijagnozom karcinoma pluća nemalih stanica. U svrhu ove analize povezanosti napravljen je Fisherov test. Provjerena je povezanost razdiobe genotipova testiranih polimorfizama s kliničkim parametrima prisutnim kod ispitanika s dijagnozom karcinoma pluća, kao što su TNM status, stadij bolesti i preživljenje. U tu svrhu su pripremljene tablice kontingencije i izračunata je p vrijednost, a rezultati ovih analiza prikazani su u Tablicama 7 i 8.

Da bi ustanovili postoji li povezanost genotipa s preživljenjem ispitanika koji boluju od karcinoma pluća izrađene su Kaplan-Meierove krivulje te je pomoću log-rank testa izračunat statistički utjecaj genotipa na preživljenje. Period praćenja preživljenja bio je 5 godina. Dobivene krivulje su prikazane na slici 5.

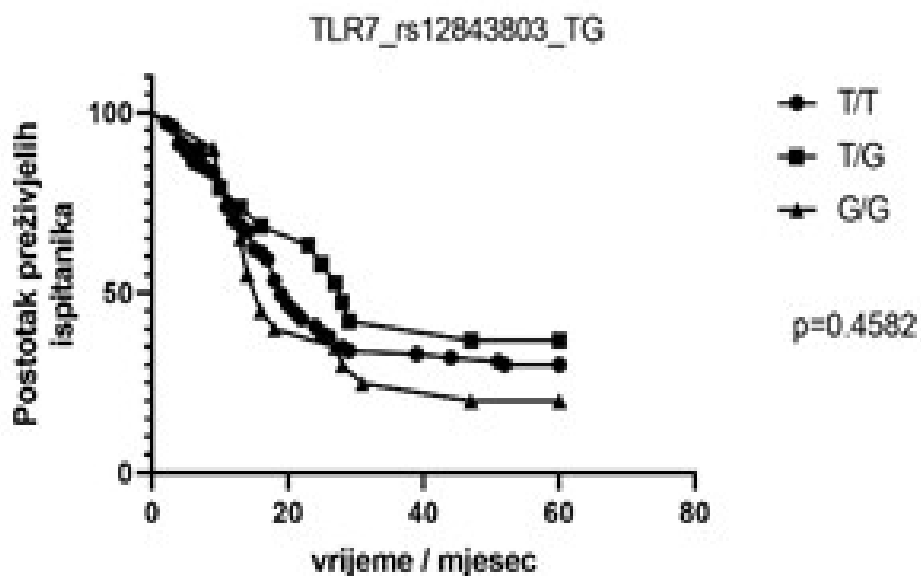
Rezultati ovih analiza pokazali su da je polimorfizam rs12843803 statistički značajno povezan samo sa stupnjem zahvaćenosti limfnih čvorova (N). Naime, rezultati Fisherovog testa pokazuju da postoji statistički značajna raspodjela polimorfnog genotipa u ispitanika s različitim stupnjem zahvaćenosti limfnih čvorova ( $p=0,02453$ ). Nadalje, kada smo ispitili moguću povezanost testiranog polimorfnog biljega s preživljenjem ispitanika, rezultati su

pokazali da ne postoji statistički značajna povezanost preživljenja i rs12843803 polimorfizma ( $p=0,4582$ ).

**Tablica 7.** Rezultati analize povezanosti genotipa rs12843803 s kliničkim parametrima (Fisherov test)

rs12843803	
Klinički parametar	p vrijednost
T status	0,7825
N status	<b>0,02453</b>
M status	0,3723
Stadij	0,2041

**Slika 5.** Rezultati analize ovisnosti preživljenja o genotipu rs12843803 u ispitanika s karcinomom pluća. Kaplan-Meierova krivulja povezanosti razdiobe genotipova testiranog polimorfnog biljega rs12843803 s petogodišnjim preživljenjem ispitanika s karcinomom pluća nemalih stanica.



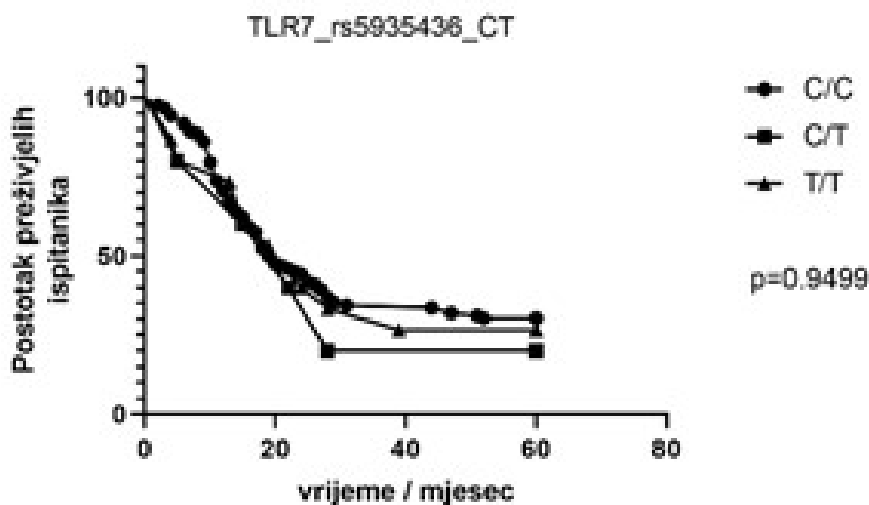
Rezultati analize povezanosti polimorfnog biljega rs5935436 s navedenim kliničkim karakteristikama ispitanika pokazali su da ne postoji statistički značajna povezanost testiranog polimorfnog biljega ni s jednim kliničkim parametrom (Tablica 8.), a isto se pokazalo i za povezanost genotipa s preživljenjem ispitanika s dijagnosticiranim karcinomom pluća (P=0,9499) (Slika 6.)

**Tablica 8.** Povezanost genotipa s kliničkim parametrima (Fisherov test)

rs5935436	
Klinički parametar	Razina značajnosti
T status	0,3691
N status	0,1638
M status	0,7543
Stadij	0,4237

T- tumor  
N- nodus  
M - metastaze

**Slika 6.** Rezultati analize ovisnosti preživljenja o genotipu rs5935436 u ispitanika s karcinomom pluća. Kaplan-Meierova krivulja povezanosti razdiobe genotipova testiranog polimorfnog biljega rs5935436 s petogodišnjim preživljenjem ispitanika s karcinomom pluća nemalih stanica.



Zaključno možemo reći da je od dva testirana polimorfna biljega smještena u promotorskoj regiji gena *TLR7*, polimorfizam rs5935436 pokazao statistički značajnije rezultate u analizi povezanosti razdiobe testiranih genotipova sa sklonošću za razvoj karcinoma pluća. Naime, rezultati asocijacijske studije su pokazali da je manje zastupljeni alel i u heterozigotnoj i u homozigotnoj formi statistički značajno povezan sa sklonošću za razvoj karcinoma pluća. S druge strane, rezultati analize povezanosti razdiobe genotipova s kliničkim parametrima su pokazali da postoji statistički značajna povezanost raspodjele alela polimorfizma rs12843803 i stupnja zahvaćenosti limfnih čvorova (nodusa).

S obzirom na činjenicu da su rezultati ranije provedenih analiza u uvjetima *in vitro* pokazali da duljina promotorske regije koja se kloniranjem unosi u reporterski sustav ima značajan utjecaj na rezultate ispitivanja funkcionalnosti promotora, u daljnjim analizama usmjerili smo se isključivo na polimorfni biljeg rs5935436. Naime, što je duljina promotorske regije uklonirana u konstrukt bila dulja, smanjivala se aktivnost promotora. Kako je polimorfizam rs12843803 smješten na poziciji -8873 koja je značajno udaljena od startnog kodona, funkcionalne studije u ovom istraživanju nisu uključivale navedeni polimorfizam.

#### **5.4 Rezultati funkcionalne analize varijante gena TLR7 rs5935436**

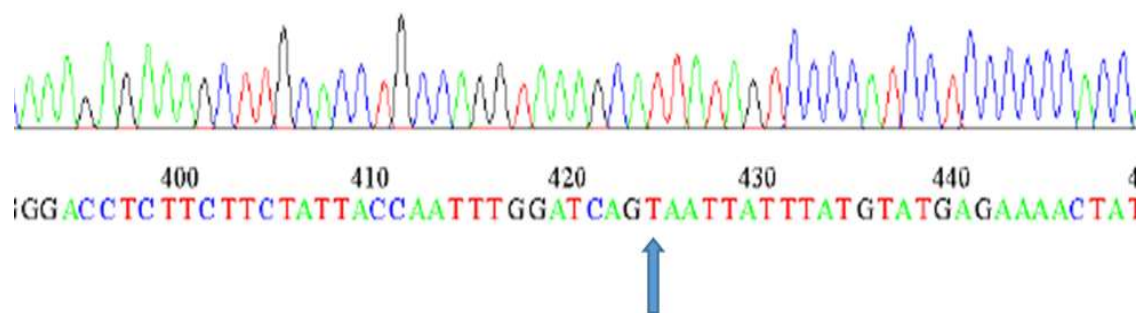
Rezultati asocijacijskih studija pokazali su da je polimorfni biljeg rs5935436 CT statistički značajno povezan s rizikom za razvoj karcinoma pluća nemalih stanica. Cilj funkcionalne analize bio je ispitati ima li prisutnost mutacije/polimorfizma u promotorskoj regiji gena učinak na ekspresiju gena *TLR7*, u *in vitro* modelu. U tu svrhu koristili smo plazmidni konstrukt pGL3 koji sadrži divlji tip promotorske regije humanog gena *TLR7*, smještenog ispred gena za luciferazu. Na taj način je gen za luciferazu (reporterski gen) pod direktnom kontrolom promotora od interesa, a razina oslobođene svjetlosti proporcionalna aktivnosti promotora. Ovaj pristup korišten je kako bi se kvantificirao učinak mutacije/polimorfizma na razinu ekspresije gena od interesa.

##### *5.4.1 Rezultati analize ciljane mutageneze i stvaranja konstrukta*

Za potrebe ove analize bilo je neophodno konstruirati plazmidni vektor koji nosi promotorsku regiju gena *TLR7* s određenom mutacijom. Metodom ciljane mutageneze je u sekvencu promotora uvedena mutirana sekvenca, a rezultati ove analize prikazani su na slici 7. Naime, nakon opisanog postupka ciljane mutageneze, selekcijom dobivenih kolonija u bakterijskim kulturama, izolirali smo plazmidnu DNA, tj. konstrukte za koje smo metodom

sekvencioniranja utvrdili da nose mutiranu varijantu promotorske regije gena od interesa. Selektirane su samo one kolonije kod kojih je sekvenca C prešla u T.

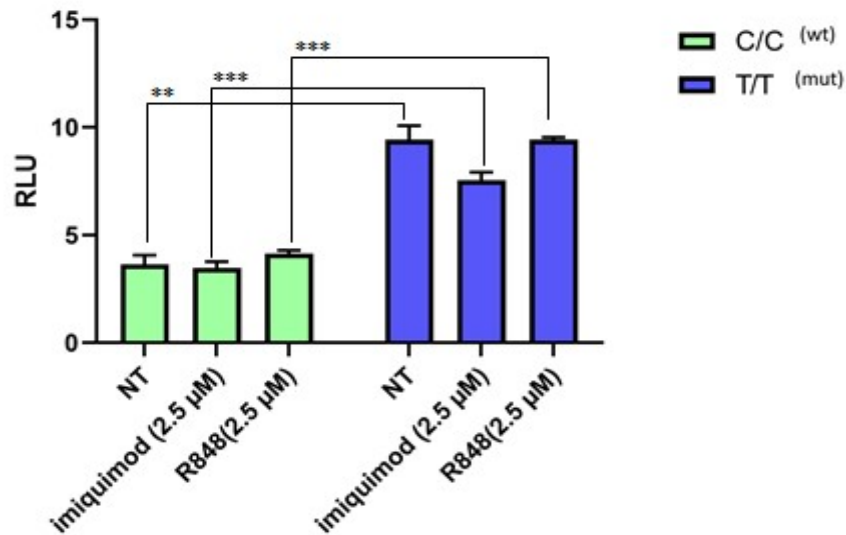
**Slika 7.** Rezultati određivanja slijeda nukleotida u svrhu provjere uspješnosti reakcije ciljane mutagenaze. Nukletidni slijed plazmida hTLR7pt2 T dobiven metodom sekvencioniranja po Sangeru.



#### 5.4.2 Rezultati dual-glo luciferazne analize

Cilj ove analize bio je ispitati ima li identificirana varijanta u promotorskoj regiji gena *TLR7* učinak na razinu ekspresije samog gena, u *in vitro* uvjetima stimulacije specifičnim ligandima, i bez stimulacije. Nakon što smo ustanovili da je ciljane mutagenaze uspješna, dobiveni plazmidni konstrukt, zajedno s konstruktom divljeg tipa, koristili smo za dual-glo luciferaznu analizu. U tu svrhu stanice su nasađene i tretirane specifičnim ligandima, ili ostavljene ne stimulirane, na opisan način. Rezultati ove analize prikazani su na slici 8.

**Slika 8.** Rezultati relativne luciferazne aktivnosti divljeg tipa promotorske regije gena TLR7 (zeleno) i mutirane varijante promotorske regije (plavo) pri stimulaciji sintetskim ligandima imiquimodom i R848. Rezultati su izraženi u RLU (*od engl. Relative Light Units*), a standardna devijacija izračunata je iz vrijednost RLU iz triplikata jednog pokusa. NT označava nestimulirane transficirane H1299 stanice.



Rezultati ove analize pokazuju da stanice kotransfecirane s konstruktom koji nosi mutiranu varijantu rs5935436 u promotorskoj regiji gena TLR7, u uvjetima endogene aktivnosti (nestimulirane stanice – NT) pokazuju statistički značajno povećanu aktivnost luciferaze, u odnosu na stanice transfecirane divljim tipom. Isti rezultati dobiveni su i nakon stimulacije nasađenih stanica specifičnim sintetičkim ligandima za TLR7 – imiquimodom i R848. Rezultati koje smo dobili nedvojbeno pokazuju da prisutnost varijante rs5935436 u promotorskoj regiji gena koji kontrolira ekspresiju gena za luciferazu u značajnoj mjeri utječe na razinu ekspresije gena za luciferazu, koja je proporcionalna razini aktivnosti gena. Stoga smo zaključili da bi prisutnost ove varijante u promotorskoj regiji gena *TLR7* mogla u značajnoj mjeri utjecati i na povećanje razine ekspresije gena *TLR7*.

## 5.5 Rezultati analize relativne ekspresije gena *TLR7* i *IFN $\gamma$* i povezanosti s preživljenjem kod osoba s poznatim *TLR7* genotipom

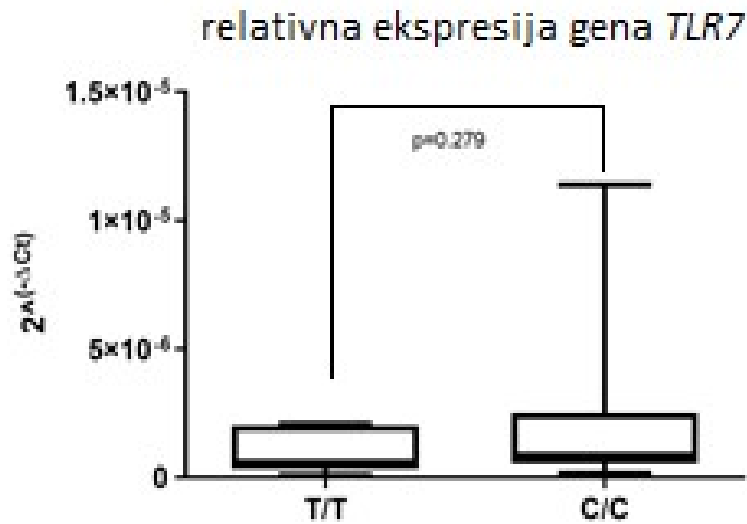
Cilj ove analize bio je ispitati ima li prisutnost promotorske varijante gena *TLR7*, rs5935436 učinak na razinu ekspresije gena *TLR7* u stvarnim uzorcima tkiva tumora kod ispitanika s poznatim genotipom. Također, cilj nam je bio ispitati i postoji li korelacija između ekspresije gena *TLR7* i nizvodne molekule u *TLR7*-signalnom putu – *IFN $\gamma$* . Cilj nam je bio ispitati je li razina ekspresije gene, stratificirana na osnovu specifičnog genotipa, povezana s preživljenjem ispitanika s dijagnosticiranim karcinomom pluća nemalih stanica.

U svrhu provjere razine ekspresije gena *TLR7* i *IFN $\gamma$* , u osoba s poznatim genotipom za SNP rs5935436, napravljena je analiza na ukupno izoliranoj RNA, metodom RT-qPCR-a. U tu svrhu iz parafinskih rezova izolirana je ukupna RNA i prije same analize provjerena joj je kvaliteta. Rezultati tih analiza pokazuju da je izolirana RNA, iz parafinskih uzoraka tkiva tumora, značajno degradirana što upućuje na lošiju kvalitetu. Stoga je prije analize kvantifikacije napravljena predamplifikacija ukupne RNA sa svim hidrolizirajućim probama koje će biti uključene u analizu (proba za *TLR7*, *IFN $\gamma$*  i *AKTB* gen). Tako pripremljena cDNA analizirana je qPCR-om sa specifičnim hrdilozirajućim probama za gene *TLR7* i *IFN $\gamma$* , kao i za gen *AKTB*, koji je služio kao endogena kontrola u analizi. Rezultati analize kvantifikacije gena *TLR7* i *IFN $\gamma$*  prikazani su u slikama 9 i 10.

Rezultati ovih analiza pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u razini ekspresije testiranih gena kod ispitanika s mutiranom varijantom gena *TLR7* i ispitanika s divljim tipom gena. Iako nije uočena statistički značajna razlika, važno je napomenuti da postoji pozitivan trend koji je u skladu s rezultatima in vitro studije. Naime, rezultati ovih studija upućuje na to da oni ispitanici koji imaju mutiranu varijantu gena *TLR7*, u uzorcima tkiva pokazuju trend povećanja ekspresije gena.

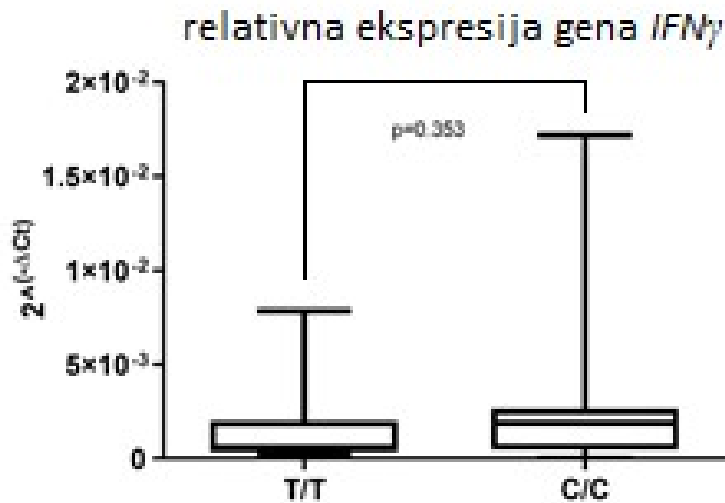


**Slika 9.** Relativna ekspresija gena *TLR7*, određena RT-qPCR metodom. U analizu su bila uključena tkiva ispitanika s dominantnim homozigotnim (*C/C*) i recesivnim homozigotnim genotipom (*T/T*) za rs5935436 u promotorskoj regiji *TLR7* gena.



Nadalje, ispitanici koji su nosioci mutirane varijante gena *TLR7* također pokazuju trend povećanja ekspresije izvodne molekule,  $IFN\gamma$ . Iz navedenog vidimo da rezultati *in vitro* i *ex vivo* studija pokazuju određeni trend preklapanja, te da je za konačnu potvrdu neophodno povećati broj ispitanika, tj. broj uzoraka tkiva s poznatim genotipom. Nažalost, do završetka ove studije nismo bili u mogućnosti doći do većeg broja tkiva s poznatim genotipom dovoljno dobre kvalitete.

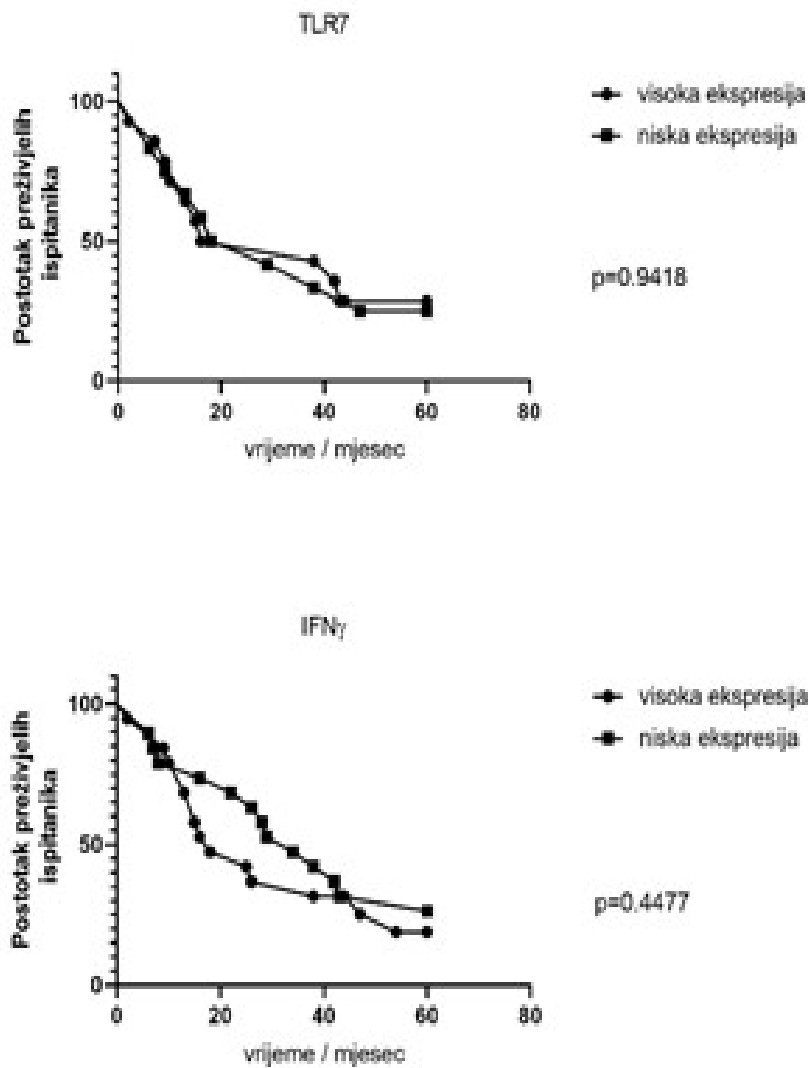
**Slika 10.** Relativna ekspresija gena *IFN $\gamma$* , određena RT-qPCR metodom. U analizu su bila uključena tkiva ispitanika s dominantnim homozigotnim (C/C) i recesivnim homozigotnim genotipom (T/T) za rs5935436 u promotorskoj regiji TLR7 gena.



Ispitana je i povezanost razine ekspresije testiranih gena, *TLR7* i *IFN $\gamma$*  s preživljenjem ispitanika s karcinomom pluća nemalih stanica. U tu svrhu rezultati ekspresije testiranih gena u tkivima tumora ispitanika bili su podijeljeni u dvije skupine; skupina s visokom i skupina s niskom razinom ekspresije. Podijela razine ekspresije gena bila je određena prema medijanu ekspresije.

Rezultati ovih analiza pokazuju da ne postoji statistički značajna povezanost između preživljenja ispitanika s karcinomom pluća i ekspresije testiranih gena, *TLR7* ( $p=0,9418$ ) i *IFN $\gamma$*  ( $p=0,4477$ ) (Slika 11).

Slika 11. Povezanost preživljenja ispitanika s karcinomom pluća nemalih stanica i razine ekspresije gena TLR7 i *IFN $\gamma$* . Kaplan-Meierova krivulja povezanosti razdiobe ekspresije testiranih gena s petogodišnjim preživljenjem ispitanika s karcinomom pluća nemalih stanica.



## **5.6 Rezultati imunohistokemijske analize tumorskog mikrookoliša kod osoba s poznatim TLR7 genotipom**

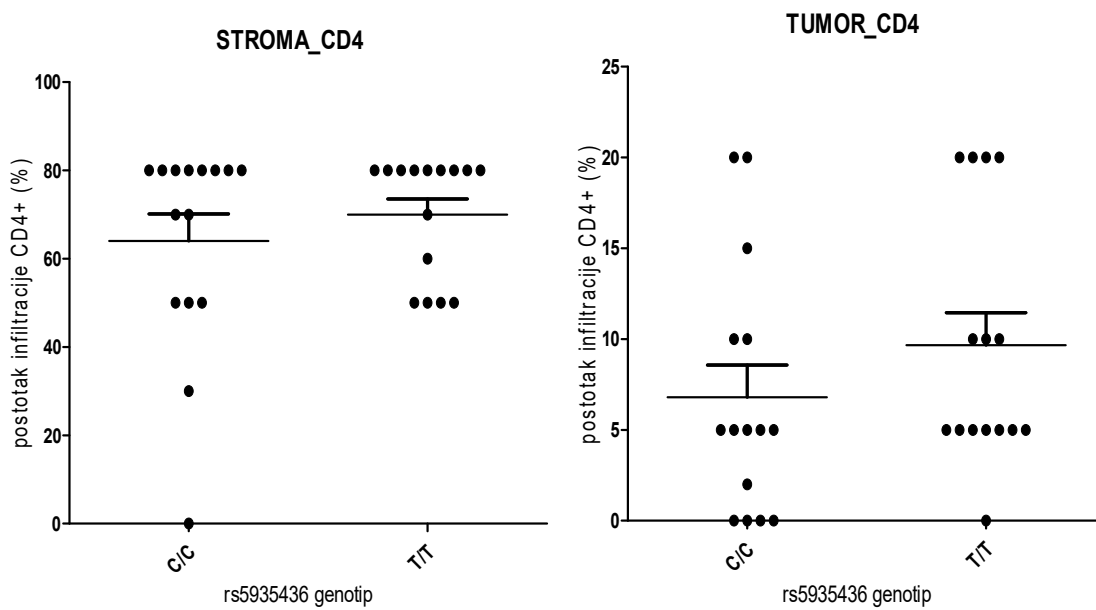
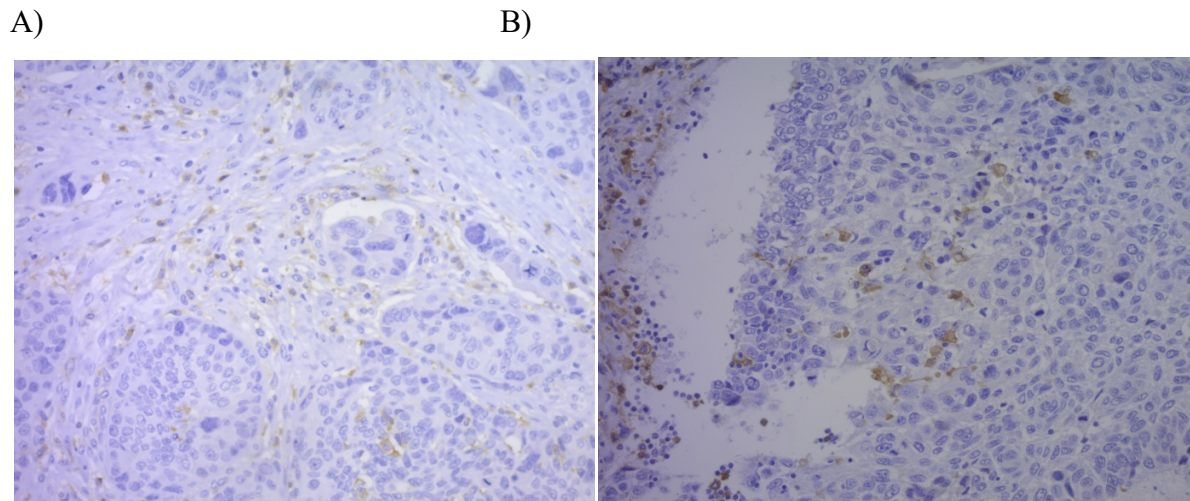
U ovom dijelu istraživanja opisan je utjecaj prisutnosti mutacije u promotorskoj regiji gena TLR7 na profil mikrookoliša tkiva tumora, prije svega u kontekstu stupnja infiltracije određenih stanica imunološkog sustava. Naime, željeli smo vidjeti ima li razlike u stupnju infiltracije stanica limfocita T, CD4+ i CD8+, u tkivo strome i tumorskih otočića, a s obzirom na prisutnost poznatog TLR7 genotipa (rs5935436). Imunohistokemijski smo obradili ukupno 30 uzoraka tumorskog tkiva, prikupljenog u ovom istraživanju. Uzorke smo podijelili u dvije skupine – 15 ispitanika s definiranim CC genotipom i 15 s TT genotipom.

Rezultati ispitivanja stupnja infiltracije stanica limfocita T u tkivo strome i tumorskih otočića prikazani su u Tablici 9. Rezultati prikazani u tablici predstavljaju postotak prisutnih limfocita T u analiziranim segmentima tkiva kojima smo obuhvatili tumorski mikrookoliš – stanicama strome i tumorskih otočića. Isti su definirani kao nakupine preko 5 stanica; brojanje je obavljeno svjetlosnom mikroskopijom na 10 velikih vidnih polja povećanja 400 puta. Analizirajući razlike u zastupljenosti pojedinih podtipova limfocita T, klasičnim t- testom nismo uspjeli dokazati statističku značajnost među testiranim segmentima, koja bi sugerirala utjecaj prisutnosti specifičnog genotipa TLR7 na sastav mikrookoliša. Naime, prepostavili smo da bi različita razina ekspresije TLR7 gena, ovisna o genotipu, mogla imati utjecaj i na sastav mikrookoliša tumora.

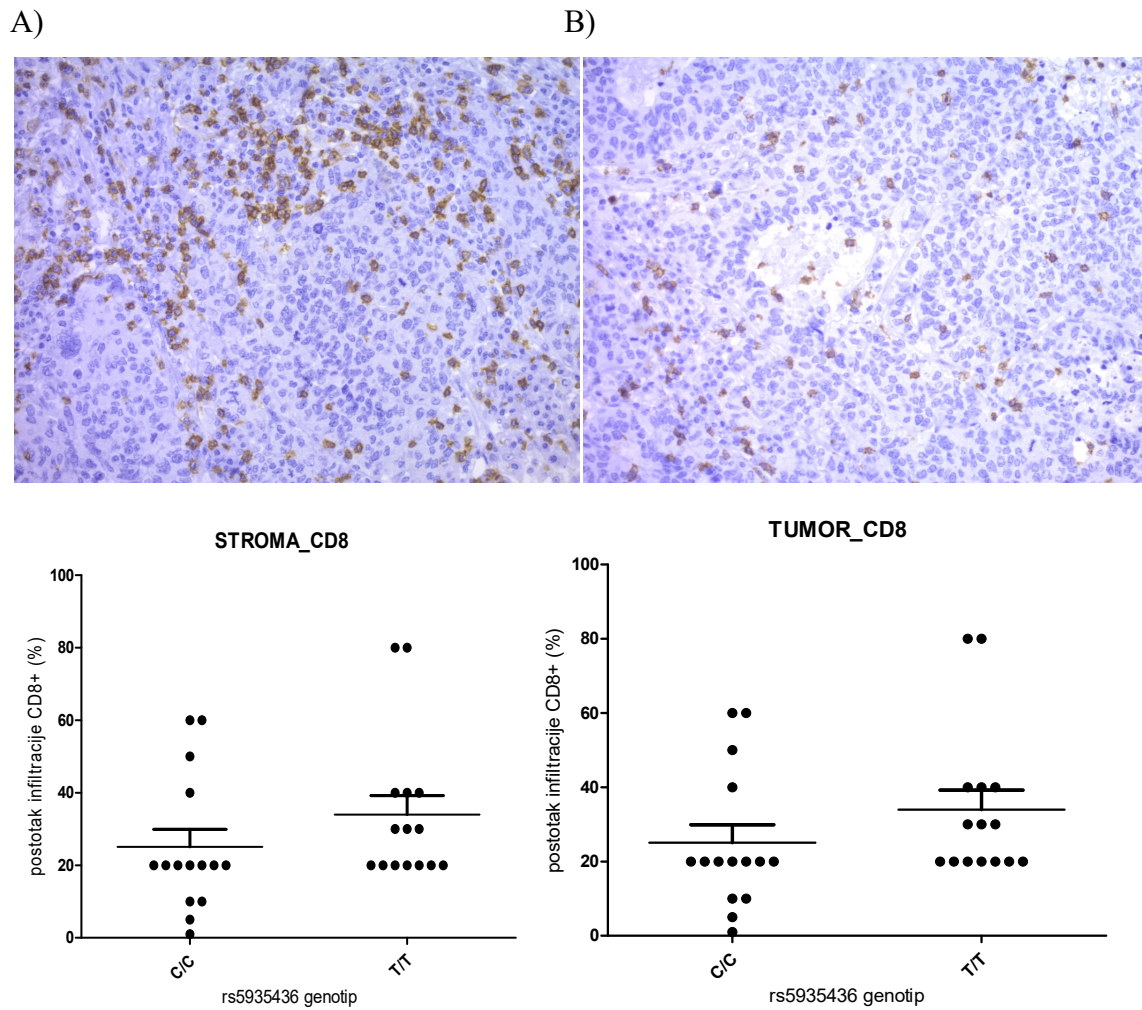
**Tablica 9.** Prikaz stupnja infiltracije limfocita T (CD4+ i CD8+) u analiziranim segmentima tkiva tumora – tumorska stroma tumora i tumorski otočići.

<b>ISPITANICI</b>	<b>CD4+ (%)</b>		<b>CD8+ (%)</b>	
<b>ISPITANICI S GENOTIPOM C/C</b>	<b>STROMA</b>	<b>OTOČIĆ</b>	<b>STROMA</b>	<b>OTOČIĆ</b>
10120	70	5	20	5
10765	50	0	20	10
11735	80	5	20	5
12210	50	0	20	5
12289	80	20	60	50
12364	80	10	50	40
12539	80	10	40	20
12545	30	2	5	5
14417	80	0	20	5
17281	50	15	10	5
17444	70	5	10	0
4112	80	5	20	5
7580	0	0	0	0
9507	80	20	20	5
16917	80	5	60	20
<b>ISPITANICI S GENOTIPOM T/T</b>	<b>STROMA</b>	<b>OTOČIĆ</b>	<b>STROMA</b>	<b>OTOČIĆ</b>
12698	80	5	80	30
13205	80	20	80	30
13214	80	5	30	10
13457	80	5	20	5
1499	70	5	20	5
16918	80	5	20	5
17793	50	10	40	10
20533	50	20	40	20
3260	80	20	20	5
4270	50	5	30	10
4334	80	5	20	5
5911	80	10	40	10
8154	80	20	20	5
12779	50	0	30	5
17572	60	10	20	0

**Slika 12.** Prikaz rezultata analize infiltracije tkiva strome (A) i tumorskih otočića (B) sa stanicama CD4+ limfocitima T. Analiza je rađena između dvije skupine ispitanika, onih s genotipom (C/C) i s genotipom (T/T) za polimorfizam rs5935436 u promotorskoj regiji TLR7 gena.



**Slika 13.** Prikaz rezultata analize infiltracije tkiva strome (A) i tumorskih otočića (B) sa stanicama CD8+ limfocita T. Analiza je rađena između dvije skupine ispitanika, onih s genotipom (C/C) i s genotipom (T/T) za polimorfizam rs5935436 u promotorskoj regiji TLR7 gena.



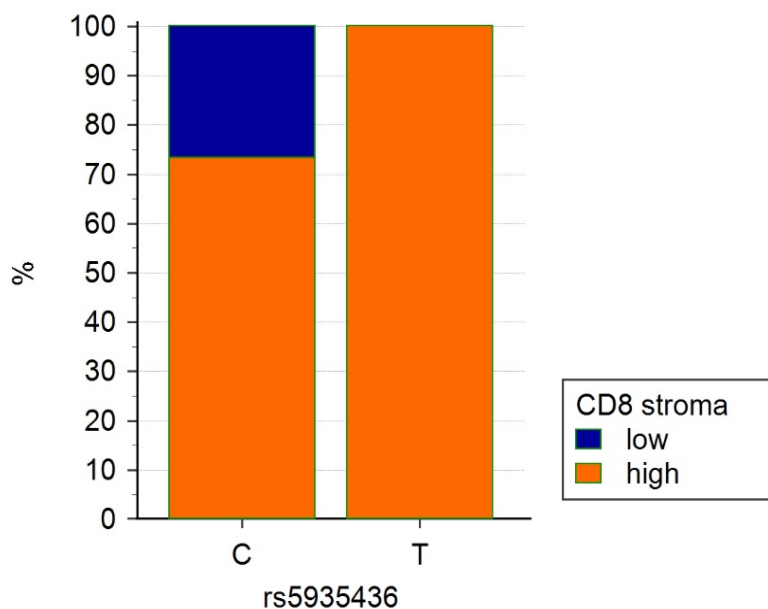
Međutim, kada smo rezultate stupnja infiltracije u analizirane segmente tkiva podijelili prema stupnju infiltracije (niski i visoki), te odredili *cut-off* vrijednosti pomoću ROC analize, pronašli smo statistički značajnu razliku u stupnju infiltracije CD8+ limfocita T u tumorskoj stromi, koja je bila ovisna o genotipu ( $p=0,0347$ ). Rezultate smo prikazali u Tablici 10. i na Slici 14.

**Tablica 10.** Zastupljenost CD4 i CD8 limfocita u stromi tumora i tumorskih otočića za rs5935436 u promotorskoj regiji TLR7 gena prema stupnju infiltracije (ROC analiza).

	rs5935436 CC / TT			
	CD4		CD8	
	STROMA	OTOČIĆ	STROMA	OTOČIĆ
<i>Niska / visoka (ROC)</i>	30*	2	10	5
Chi-squared test	0,1501	0,0726	<b>0,0347*</b>	0,4637

\* vrijednosti više od navedenih definirane su kao „visoke“

**Slika 14.** Prikaz zastupljenosti CD4 i CD8 limfocita u stromi tumora i tumorskih otočića za rs5935436 u promotorskoj regiji TLR7 gena prema stupnju infiltracije.





Na temelju navedenog, možemo reći da prisutnost polimorfizma rs5935436 u promotorskoj regiji gena TLR7, za koji smo in vitro metodama pokazali da povećava stupanj ekspresije gena TLR7, ima utjecaj i na sastav tumorskog mikrookoliša, u kontekstu stupnja infiltracije stanica imunološkog sustava, u prvom redu limfocita T (CD8+).

## 6 RASPRAVA

Karcinom pluća vodeći je uzrok smrti u skupini malignih bolesti širom svijeta. Mehanizmi nastanka ove izrazito maligne bolesti su još uvijek nerazjašnjeni, ali kronični upalni odgovor uz kroničnu izloženost štetnim tvarima smatra se vodećim uzročnikom pokretanja kaskade molekularnih događaja koji će u konačnici dovesti do maligne alteracije stanica (70,71).

Već dugi niz godina je u fokusu mnogih istraživanja uloga urođenog imunološkog odgovora u nastanku i razvoju različitih karcinoma, pa tako i karcinoma pluća. Osobita pozornost usmjerena je na genetičku varijabilnost molekula koje sudjeluju u ključnim procesima aktivacije i regulacije imunološkog odgovora i razrješenja upalnih procesa. Rezultati tih istraživanja ukazali su na to da su polimorfizmi različitih gena za TLR povezani s mnogobrojnim malignim bolestima kao što su karcinomi kolona, prostate, želuca i uterusa (94). Istraživanja su pokazala značajnu ulogu antagonistu TLR7 u blokiranju čimbenika rasta tumorskih stanica, smanjenja medijatora upale (osobito u autoimunim bolestima), pa čak do usporavanja progresije tumorskih stanica u karcinomu pankreasa (108-110). Aktivacija TLR-a sudjeluju u pokretanju imunološkog odgovora, te potiče aktivaciju i proliferaciju imunoloških stanica, njihovom regurgitiranju na mjesto „ozljede“, ali i u procesima stanične smrti (83). S obzirom na to da je TLR7 izražen ne samo na tumorskim stanicama NSCLC-a nego i na stanicama imunološkog sustava koje infiltriraju tkivo tumora i imaju značajnu ulogu u tijeku i prognozi bolesti, istraživanje uloge TLR7 u prognozi, tijeku i liječenju karcinoma pluća od iznimnog je značenja. U želji za novim spoznajama u praćenju i liječenju bolesnika u ovom smo istraživanju pokušali rasvijetliti molekularnu osnovu karcinoma pluća nemalih stanica uzimajući u obzir genetičku varijabilnost, njezin utjecaj na razinu ekspresije TLR7 gena i proteina te povezanost tih parametara s kliničkim obilježjima bolesti. Rezultati ove studije pokazali su da postoji statistički značajna povezanost polimorfnog biljega smještenog u promotorskoj regiji gena *TLR7* s nastankom i razvojem karcinoma pluća. Rezultati su također pokazali da prisutnost jedne od testiranih varijanti značajno utječe na razinu ekspresije gena, u uvjetima *in vitro* te da je razina ekspresije gena *TLR7* povezana sa stupnjem infiltracije u tumorskom mikrookolišu.

Vodeći se kriterijima koje smo postavili ranije (učestalost manje zastupljenog alela u općoj populaciji veća od 1% te smještaj u promotorskoj regiji gena) odabrali smo dva polimorfna biljega gena TLR7 koji su smješteni u promotorskoj regiji gena - rs5935436 CT i rs12843803 TG. S obzirom na to da je od prije poznato da polimorfizmi smješteni u promotorskoj regiji

gena mogu djelovati na razinu ekspresije tog gena kao i na ishod aktivacije različitih signalnih puteva, pretpostavili smo da bi ta genetička varijabilnost mogla dati odgovore na pitanja o opisanim *in vitro* i kliničkim posljedicama promjenjene ekspresije gena TLR7 i povezanosti s promjenjenim urođenom imunološkim odgovorom organizma.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je polimorfizam rs5935436 CT (uspoređivana učestalost alela testiranog SNP-a između testiranih skupina, bez prilagodbe na dob, spol i status pušenja) statistički značajno povezan s rizikom za razvoj karcinoma pluća. Naime, za testirani polimorfizam je otkriveno da je prisutnost mutiranog alela povezana s povećanim rizikom za razvoj karcinoma pluća (C/T + T/T) ( $p=0,0122$ ). Rezultati ove analize pokazali su da prisutnost mutiranog alela daje veći izgled da će osobe koje su nosioci oboljeti od karcinoma pluća. Također, pokazali smo da je raspodjela heterozigotnog alela (C/T) statistički značajno učestalija u ispitanika s karcinomom pluća ( $p=0,0001$ ).

Povezanost odabranih polimorfni biljega s kliničkim parametrima pacijenta oboljelih od NSCLC-a bila je također jedan od ciljeva našeg istraživanja. Utjecaj polimorfni biljega na TNM status, stadij bolesti i preživljenje otvorio bi mogućnost novih modaliteta liječenja. Analizom raspodjele polimorfni alela među skupinom ispitanika s različitim TNM statusima i stadijima bolesti, pokazali smo da je prisutnost polimorfni alela rs12843803 TG statistički značajno povezana s N statusom, odnosno stupnjem prodora tumora u limfne čvorove u ispitanika s dijagnosticiranim karcinomom pluća ne-malih stanica. Nadalje, rezultati relativne ekspresije gena TLR7 i IFN $\gamma$  na uzorcima tkiva ispitanika s definiranim rs5935436 CT genotipom pokazali su samo nominalnu povezanost prisutnosti mutacije i povećanja ekspresije testiranih gena. Ovim analizama prethodila je *in vitro* studija u kojoj smo pokazali da prisutnost mutirane varijante u promotoru značajno utječe na razinu ekspresije/aktivnosti reporterskog gena, luciferaze. *Ex vivo* analiza na uzorcima tkiva djelomično je potvrdila naše *in vitro* rezultate, no važno je napomenuti da se radilo o relativno malom broju uzoraka koji su bili uključeni u tu analizu. Analiza na većem broju jednako definiranih uzoraka biti će od izuzetne važnosti za potvrdu *in vitro* rezultata.

Chatterjee i suradnici proveli su istraživanje na 352 pacijenta oboljela od NSCLC-a (stadij I-III) koji su primarno operirani, te na 210 pacijenta koji su prvo primili neoadjuvantnu kemoterapiju (44). Kada su uzorke tkiva tumora stratificirali na osnovu razine ekspresije gena TLR7, u skupini primarno operiranih pacijenta s više od 82% ekspresije TLR7 na tumorskim stanicama ukupno preživljenje (OS) iznosilo je samo 36 mjeseci, dok je u onih s ekspresijom manjom od 82% OS iznosio 72 mjeseca ( $p=0,002$ ) (44). U istom istraživanju su pokazali da je u pacijenta s neoadjuvantom primjenom kemoterapije uz višu ekspresiju TLR7 značajno lošiji

odgovor na terapiju, uz zaključak da bi inhibicija TLR7 ekspresije na tumorskim stanicama odvela do utišavanja upalnih procesa i smanjenja rasta tumora (44). Baš kao i u našem istraživanju pronađena je značajna povezanost povećane ekspresije TLR7 i metastaza u limfne čvorove.

Nadalje, Baglivo i suradnici su potvrdili da viša ekspresija TLR7 gena u pacijenta s IV. stadijem NSCLC-a dovodi do značajno slabijeg učinka imunoterapije i lošijeg ishoda (111). U našem istraživanju 85,43% oboljelih od NSCLC-a su bili pušači ili bivši pušači i 66,16% oboljelih su bili muškarci. Slična kliničko patološka obilježja imaju i ispitanici u studiji Bagliva i suradnika. Istraživanjem su pokazali da je smanjenje ekspresije gena *TLR7* nezavisan prediktor za slab klinički odgovor na imunoterapiju ( PFS 1,5 naspram 9,5 mjeseci;  $p=0,001$ , OS 3,2 naspram 26,7 mjeseci;  $p=0,03$ ) što je posljedica uloge *TLR7* gena u urođenom imunološkom odgovoru (111). Rezultati ovog istraživanja naime ukazuju na važnu ulogu gena TLR7 i razine njegove ekspresijeu procjeni i određivanju ispitanika koji će odgovoriti na planirani protokol imunoterapije, tzv. „respondera“ i onih koji neće, tzv. „non respondera“. Pretpostavlja se da je sposobnost tumora da izbjegne destruktivno djelovanje imunološkog sustava vjerojatno posljedica inhibicije čimbenika aktivacije molekula koje sudjeluju u imunosupresiji, te se na taj način stvara pogodno okruženje za rast tumorskih stanica koje ovim procesima izbjegavaju imunološki napad organizma i dobijavu pozitivno okruženje za potencijal rasta.

*TLR7* gen je primarno izražen na plazmocitnim dendritičkim stanicama, B stanicama i monocitima (112,113). Smatra se da aktivacija TLR7 eksprimiranog na stanicama limfocita B inducira i potiče tek diferencijaciju i proliferaciju citokina, dok se aktivacijom putem plazmacitih dendritičkih stanica inducira ekspresija IFN- $\alpha$  i potiče značajna proizvodnja citokina i agonista TLR7 što u konačnici vodi k stvaranju snažnog upalnog odgovora (112-114).

Uloga TLR7 gena u nastanku i razvoju karcinoma je kompleksna, ali često i kontradiktorna s obzirom na različite mehanizme djelovanja gena *TLR7* ovisno o tome radi li se o ekspresiji gena tumorskih stanica ili stanica imunološkog sustava. Aktivacija TLR7 u tumorskim stanicama potiče proliferaciju tumora, koči programiranu smrt stanice ili apoptozu, potiče invaziju tkiva tumorskim stanicama te inducira proizvodnju upalnih čimbenika koji postaju neosjetljivi na stanice imunskog sustava (115). Uslijed navednog dolazi i do metastaziranja tumora i daljnjeg umnažanja tumorskih stanica koje su izbjegle apoptozu. Može se zaključiti da ukoliko aktivacija TLR7 potiče upalno okruženje, tj. potiče lučenje proupalnih čimbenika), za posljedicu može imati protumorski učinak. Možemo reći da je TLR7 zapravo „gen s

dvostrukom ulogom“, a za njegovu ulogu u osjetljivosti na liječenje potrebno je dobro poznavati njegovu funkciju u tumorskim stanicama i stanicama imunskog sustava koje su se aktivirale kao reakcija na prisutnost tumora. Nadalje, kao što je već napomenuto u uvodu, TLR-i, pa tako i TLR7, važna su poveznica između kronične upale i razvoja maligne transformacije stanica. Dobar primjer je povezanost kronične opstruktivne plućne bolesti (KOPB) i nastanka karcinoma pluća. Naime, poznato je da je KOPB najveći faktor rizika za razvoj karcinoma pluća, neovisno o statusu izloženosti duhanskom dimu. Od ranije je poznato da pacijenti oboljeli od KOPB-a imaju i do tri puta veći rizik za razvoj karcinoma pluća u odnosu na zdravu populaciju (116). Prihvaćena je teorija da i KOPB i karcinom pluća ima zajedničku osnovnu podlogu a to je sistemna upala. Uslijed oštećenja plućnog tkiva štetnim reagensima pokreće se niz imunoloških reakcija i mehanizama koji rezultiraju pojačanom ekspresijom interleukina, makrofaga, citokina i dendritičkih stanica. Glavnu ulogu u detektiranju štetnih tvari koje dovode do cijelog ovog niza reakcija imaju TLR receptori od kojih osobit značaj u karcinomu pluća imaju TLR7 i TLR8 receptori preko signalnog puta NF- $\kappa$ B (48,117). Aktivacija transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B započinje djelovanjem upalnih medijatora i oksidativnog stresa, a aktivirani NF- $\kappa$ B potom regulira transkripciju gena za proteine upale i potiče imunološki odgovor (39,42,118). Prekomjerna aktivacija NF- $\kappa$ B ima i protutumorogeni učinak te aktivaciju dodatnih makrofaga koji su odgovorni za daljnje širenje tumora odnosno metastaze (118,119). Jedan od ciljeva našeg istraživanja bio je vidjeti postoji li razlika u razini ekspresije gena TLR7 između ispitanika s mutiranom varijantom gena (nositelja rs5935436 varijante) i ispitanika s divljim tipom gena. Također smo željeli istražiti pokazuju li ispitanici koji su nosioci mutirane varijante gena TLR7 polimorfizma rs5935436 trend povećanja ekspresije izvodne molekule IFN $\gamma$ . IFN $\gamma$  je upalni citokin koji ima centralnu ulogu u antitumorskom imunitetu. Međutim, istraživanja su pokazala da IFN $\gamma$  signalizacija potiče karcinogenezu i metastaze induciranjem upalnih odgovora, imunosupresije ili drugih nepoznatih mehanizama (120-122). Možemo zaključiti da boles može biti posljedica pojačane ekspresije TLR-ova koji su nepotrebno aktivni u nekim malignim alteracijama, ili pak posljedica neadekvatne signalizacije TLR-a što dovodi do nepotpunih i poremećenih reakcija imunološkog sustava u svrhu obrane organizma.

Zaključili smo da rezultati *in vitro* i *ex vivo* studija pokazuju određeni trend preklapanja, a u našem istraživanju bi za detaljnije analize o ekspresiji IFN $\gamma$  unutar TLR7 genotipova svakako bilo preporučljivo povećati broj uzoraka s poznatim genotipom. Također, neka istraživanja su pokazala da korištenje agonista TLR7 receptora dovodi do promjene sastava stanica unutar tkiva tumora, tj. tumorskog mikrookoliša. Tako je na primjer pokazano da

aktivacija TLR7 dovodi do smanjenja T stanica unutar tumora, povećanja IFN $\gamma$  u slezeni, povećanja broja stanica prirodnih ubojica (NK), NKT stanica i T limfocita, te aktivacije i sazrijevanja tumorskih plazmatskih dendritičkih stanica koje mogu potaknuti antitumorski odgovor (123-125). Stoga se postavlja pitanje mogućnosti primjene agonista TLR7 kao lijekova u liječenju tumora u cijelosti personaliziranim pristupom, tj. u skladu sa spoznajom o prisutnosti polimorfizama ovog gena.

U ovom istraživanju također smo ispitali i razliku u stupnju infiltracije CD4+ i CD8+ limfocita u tkivo strome i tumorskih otičića u uzorcima tkiva za koje smo znali točan genotip, odnosno prisutnost mutiranog alela. Nakon što smo uzorke stratificirali prema genotipu, analizirali smo razinu ekspresije proteina TLR7 imunohistokemijskom metodom, te statističkom metodom napravili podjelu na uzorke niske i visoke infiltracije (pomoću ROC analize), pokazali smo da postoji statistički značajna razlika u stupnju infiltracije CD8+ limfocita u tkivo strome. Dokazali smo da taj stupanj infiltracije ovisi o genotipu odnosno o prisutnosti mutacije ( $p=0,0347$ ). Drugim riječima, u prisutnosti genotipa rs5935436 T/T dolazi do značajno dublje infiltracije CD8+ limfocita u tumorsku stromu. CD8+ je transmembranski glikoprotein koji se većinom nalazi na površini citotoksičnih T limfocita. Studije su pokazale da CD8+ limfociti limitiraju rast malignih stanica, smanjuju infiltraciju tumora ali i da mogu poslužiti kako prognostički markeri u brojim karcinomima među kojima je i NSCLC (126-129).

U našem istraživanju 58,45% ispitanika oboljelih od NSCLC-a je ujedno bolovalo i od KOPB-a. Jackute i suradnici su istraživali distribuciju CD4+ i CD8+ limfocita u stromi i tumorskim otičićima u pacijenta s NSCLC-om u zavisnosti o pušenju i KOPB-u (130). Dokazali su značajno veći udio CD4+ i CD8+ limfocita u tkivima oboljelih od NSCLC-a u odnosu na kontrolnu skupinu, ali i značajnu razliku u raspodjeli ovih limfocita unutra tumorskog tkiva. U stromi su naime pronašli statistički značajno više i CD4+ i CD8+ stanica u odnosu na tumorske otičiće, dok su osobito u stromi pacijenta koji su imali i KOPB uz NSCLC pronašli još izraženiju infiltraciju s CD8+ limfocitima (130). Ovim su istraživanjem pokazali da KOPB ima značajnu ulogu u podlozi NSCLC-a ako gledamo distribuciju upravo CD8+ limfocita, s obzirom da su u pacijenta koji nisu bolovali od KOPB-a značajno veće nakupine CD8+ limfocita pronađene u tumorskim otičićima (130). Druga istraživanja su također potvrdila veću distribuciju CD4+ a osobito CD8+ limfocita u stromi tumora (131,132).

U našem istraživanju u prisutnosti mutiranog genotipa rs5935436 dokazana je infiltracija strome CD8+ limfocitima preko 80%.

Iz ovih rezultata možemo zaključiti da bi CD8+ stanice (za koje znamo da dovode do apoptoze tumorskih stanica) direktno mogle biti povezane s imunskim odgovorom na karcinom pluća. S obzirom na to da su Hiraka i suradnici pokazali da je dominacija CD8+ stanica u tumorskim otkočicama povezana sa skvamoznim tipom karcinoma pluća ostaje pitanje utječe li histološki tip tumora na distribuciju infiltracije CD4+ i CD8+ limfocitima (131). Svakako bi u daljnjim istraživanjima, na znatno većem broju ispitanika, bilo izuzetno korisno uzorke, osim po genotipu, stratificirati i porema histološkom tipu tumora.

S obzirom na to da se CD8+ limfociti povezuju i s odgovorom na imunoterapiju

Uloga CD8+ limfocita je značajna za prognozu i tijek liječenja. CD8+ limfociti se ističu kao poveznica između histologije/ patologije, mikrookoliša tumora i imunološkog potencijala organizma. Uz razumijevanje navedenih procesa mogao bi se pronaći model za razvoj biomarkera koji bi bili korisni za uporabu ciljane imunoterapije. U tom smjeru su i krenula brojna istraživanja. Hurkmans i suradnici su proveli istraživanje u koje su uključili pacijente koji boluju od NSCLC-a IV. stadija i primaju nivolumab (133). Dokazali su statistički značajno veći period bez progresije bolesti PFS ( $p=0,023$ ) u pacijenta koji imaju visoku infiltraciju tumorskog tkiva CD8+ limfocitima u kombinaciji s PD-L1 ekspresijom i urednog funkcijom HLA-1 (133). Kawai i suradnici su objavili istraživanje u kojem navode da u pacijenta s NSCLC-om IV. stadija, infiltracija tumorskih otkočica CD8+ limfocitima pokazuje značajno duže preživljenje u odnosu na infiltraciju strome ( $p=0,007$ ) (134). Mazzachi i suradnici su pokazali da su visoke vrijednosti cirkulirajućih NK, PD-1 i CD8+ stanica u kombinaciji s niskim omjerom PD-1/CD8+ (u limfocitima koji infiltriraju tumor) značajno produžile PFS ( $p < 0,01$ ), što predstavlja učinkovit imunološki model za uspješno liječenje PD-1 antagonistima (135). Stoga bi od iznimne važnosti za određivanje novih terapijskih protokola bilo otkriti mehanizam kojim aktivacija i regulacija TLR7 sudjeluje u tim procesima i pospješuje razvoj metastaza i time podržava daljnji rast tumora.

Za razliku od ranijih istraživanja koja smo naveli a koja povezuju ekspresiju TLR7 s limfoidnom lozom i ističu važnost CD4+ i CD8+ limfocita, Dajon i suradnici su na mišjim modelima prikazali da TLR7 ima ključnu ulogu u malignim stanicama održavanjem i regrutiranjem supresorskih stanica mijeloidne loze (136). Protočnom citometrijom mjerene su vrijednosti u tumoru, slezeni i perifernoj krvi, a uvjet je bio ekspresija TLR7 na stanicama tumora. Ubrizgavanjem TLR7 agonista u tumor dokazali su visoku ekspresiju TLR7 u makrofazima, plazmacitnim dendritičkim stanicama, te nešto manju ekspresije u konvencionalnim (mijeloidnim) dendritičkim stanicama (136). Ovo istraživanje je pokazalo da NSCLC koji izražavaju visoku razinu TLR7 imaju fenotip epitelne mezenhimalne

tranzicije s visokom ekspresijom vimentina i malom količinom E-kadherina, te su k tome izrazito skloni progresiji i metastaziranju, a čitav proces je posredovan visokim vrijednostima citokina CCL2 i GM-CSF (136). Poznato je od ranije da ova oba citokina imaju značajnu ulogu u regurtaciji suspresorskih stanica mijeloidne loze, dok njezina deplecija drastično smanjuje šansu za širenje metastaza (137,138).

Točna uloga TLR7 ekspresije u NSCLC-u je i dalje u istraživanjima, a pokušava se pronaći mehanizam i model kojima pojačana ili smanjena ekspresija dovode do utjecaja na tijek bolesti. S obzirom na postojanje brojnih polimorfizma u populaciji to svakako predstavlja velik izazov ali i moguće značajne razlike u rezultatima istraživanja.

U recentno objavljenom istraživanju Liotta i suradnika dokazano je da TLR7 posreduje u otklanjanju upale i inhibiciji angiogeneze u NSCLC-u (139). Prikazali su da povećana ekspresija TLR7 mRNA u NSCLC-u direktno povezana sa smanjenjem angiogeneze preuzimanjem regulacije medijatora angiogeneze, a istodobno smanjuje potencijal i oslobađanje vaskularnog endotelnog čimbenika rasta A (VEGF-A) iz tumorskih stanica (139). Signalni put koji uključuje aktivaciju kinaza MAPK, AKT, STAT 3, SRC, p38 i TKB1 prema njihovom istraživanju odgovoran je za anti-angiogenetsku i anti-upalnu funkciju TLR7 gena. Od ranije je poznato da povišena razina VEGF-A u pacijenta sa NSCLC-om loš prognostički čimbenik, a da je anti VEGF-A danas vodeći lijek uz koji pacijenti imaju bolju prognozu (140).

Kao što smo ranije naveli aktivacija TLR7 signalizacije ostvaruje svoj učinak uglavnom putem aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B (118). Međutim istraživanja su pokazala da usprkos aktiviranju NF- $\kappa$ B od strane TLR7, neki proupalni i angiogeni medijatori (najčešće interleukini) bivaju suprimirani u stanicama NSCLC-a (136). Ovu teoriju potkrijepili su istraživanjem koje smo ranije spomenuli, a koje navodi da protumorski učinak TLR7 gena ovisi o njegovoj ekspresiji na stanicama tumora te sposobnosti regurtacije mijeloidnih suspresorskih stanica (136).

Iz navedenog zaključujemo da TLR7 ima zaista različitu ulogu u procesima vezanim za nastanak i razvoj NSCLC-a, ovisno o tome koji signalni put je aktiviran i koje stanice imaju višu ekspresiju ovog gena. Recentno istraživanje ističe snažnu antitumorsku aktivnost resiqimoda kao TLR7 agonista u NSCLC zbog njegovih učinaka imunomodulacije tumorskog mikrookoliša (141). Drugim riječima TLR7 agonist bi imao značajno bolji inhibitorski učinak na tumorske stanice u uznapredovalom adenokarcinomu pluća u odnosu na dosadašnju anti-PDL1 terapiju ili kemoterapiju na bazi platine (141). S obzirom na različite putove ekspresije TLR7 gena za zaključiti je da korištenje različitih agonista može izazvati i različite učinke u težini i tijeku NSCLC-a.



Zaključno možemo reći da je najznačajniji rezultat ovog istraživanja što smo uspjeli povezati promjenjenu ekspresiju TLR7 gena u tumorskim stanicama (za koju su ranija istraživanja pokazala da interferira s tijekom i ishodom bolesti) s genetičkom podlogom. Točnije, pronašli smo genetički biljeg koji je statistički značajno povezan s nastankom i razvojem karcinoma pluća nemalih stanica, a ujedno i s razinom ekspresije gena. Koliko je nama poznato, do sada nije objavljen ni jedan rad s ovakvim rezultatima, vezanim za TLR7. Nadalje, u budućim istraživanjima na značajno većem broju ispitanika bilo bi od iznimnog značaja dodatno ispitati povezanost ekspresije TLR7 gena i profila drugih stanica imunološkog sustava. Prema onome što do sada znamo, čini nam se da bi upravo ti rezultati značajno doprinijeli u razvoju novih protokola u liječenju pacijenata s karcinomom pluća, ali i otkrivanju novih prognostičkih biomarkera.

## 7 ZAKLJUČCI

1. Rezultati analize povezanosti pokazali su da postoji statistički značajna povezanost prisutnosti polimorfnog alela rs5935436 CT TLR7 gena u kodominantnom modelu s rizikom za razvoj karcinoma pluća nemalih stanica.
2. Rezultati analize povezanosti pokazali su da postoji statistički značajna povezanost prisutnosti heterozigota polimorfnog biljega rs12843803 TG s rizikom za nastanak karcinoma pluća nemalih stanica.
3. Rezultati analize povezanosti pokazali su da je prisutnost polimorfnog biljega rs12843803 TG statistički značajno povezana sa stupnjem zahvaćenosti limfnih čvorova u ispitanika s karcinomom pluća nemalih stanica.
4. Rezultati funkcionalne analize luciferaznog eseja na utjecaj prisutnosti mutante na ekspresiju gena pokazali su da je prisutnost varijante rs5935436 CT u promotoru gena značajno povezana s povećanjem ekspresije gena TLR7.
5. Rezultati relativne ekspresije gena TLR7 i  $IFN\gamma$  na uzorcima tkiva ispitanika s definiranim rs5935436 CT genotipom pokazali su samo nominalnu povezanost prisutnosti mutacije i povećanja ekspresije testiranih gena što dijelom potvrđuje i rezultate *in vitro* studije.
6. Rezultati analize profiliranja tumorskog mikrookoliša pokazali su da je stupanj infiltracije CD8+ limfocita T u tumorsku stromu značajno povišen u ispitanika s genotipom rs5935436 CT.
7. Rezultati analiza povezanosti specifičnih genotipova i pridruženih kliničkih parametara prikazanih u ovoj studiji nisu pokazali povezanost polimorfnih biljega s preživljenjem niti povezanost razine ekspresije testiranih gena (TLR7 i  $IFN\gamma$ ) s preživljenjem u ispitanika s karcinomom pluća nemalih stanica.
8. Rezultati rada predstavljaju originalan doprinos znanosti i nedvojbeno pokazuju da postoji povezanost nasljedno uvjetovane povećane ekspresije gena TLR7, rizika za razvoj karcinoma pluća nemalih stanica i profila tumorskog okoliša. Neophodna su daljnja istraživanja, u *in vitro* uvjetima i na većem broju uzoraka tkiva, koja će omogućiti bolje razumijevanje uloge proteina TLR7 u nastanku i razvoju maligne transformacije stanica.

## 8 SAŽETAK

UVOD: Karcinom pluća vodeći je uzrok smrti od malignih bolesti širom svijeta. Kronična upala, kronična izloženost štetnim tvarima, narušena funkcija urođene i stečene imunosti uz genetske mutacije dovode do promjene u staničnom mikrookolišu i smatraju se najčešćim uzrokom ove teške bolesti. Ovim istraživanjem želimo dokazati povezanost genetičkih biomarkera (polimorfizama) s nastankom i razvojem karcinoma pluća nemalih stanica (NSCLC).

ISPITANICI I METODE: U istraživanje je uključeno 450 ispitanika s dijagnozom NSCLC-a te 1283 zdravih ispitanika. Genotipizacijom je određena učestalost polimorfizama TLR7 gena i njihova povezanost s TNM statusom. Metodom RT-PCR ispitana je razina ekspresije TLR7 gena i IFN $\gamma$  u uzorcima tumorskog tkiva uz analizu limfocita u tumorskom mikrookolišu.

REZULTATI: U ispitivanoj populaciji pronašli smo dva najčešća polimorfizma TLR7 gena; rs5935436 CT i rs12843803 TG koji su povezani s nastankom NSCLC-a. Prisutnost polimorfnog biljega rs12843803 TG statistički je značajno povezana sa stupnjem zahvaćenosti limfnih čvorova. Rezultati analize profiliranja tumorskog mikrookoliša pokazali su da je stupanj infiltracije CD8<sup>+</sup> limfocita T u tumorsku stromu statistički značajno povišen o genotipu rs5935436 CT.

ZAKLJUČAK: Rezultati ovog istraživanja pokazuju povezanost nasljedno uvjetovane povećane ekspresije TLR7 gena, rizika za razvoj karcinoma pluća nemalih stanica i obilježja tumorskog okoliša, što može poslužiti kao osnova za daljnja istraživanja protutumorske terapije usmjerene na funkciju TLR7 gena.

KLJUČNE RIJEČI: NSCLC, TLR7, polimorfizam, CD8<sup>+</sup> limfociti, tumorski mikrookoliš

## 9 SUMMARY

### TLR7 GENE AND PROTEIN IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Fedža Džubur, 2022.

**INTRODUCTION:** Lung cancer is the leading cause of death in the group of malignant diseases worldwide. Chronic inflammation, chronic exposure to harmful substances, impaired innate and acquired immune function with genetic mutations lead to changes in the cellular microenvironment and they are considered to be the most common cause of this severe disease. We want to prove the association of cancer genetic biomarkers (polymorphisms) with non-small cell lung cancer (NSCLC).

**SUBJECTS AND METHODS:** The study included 450 patients with NSCLC and 1283 healthy respondents. We used genotyping to determine the frequency of TLR7 gene polymorphisms and their association with TNM status. The level of TLR7 gene and IFN $\gamma$  expression in tumor tissue samples were examined by RT-PCR with analysis of the tumor microenvironment.

**RESULTS:** In our study rs5935436 CT and rs12843803 TG were the most common polymorphisms of the TLR7 gene associated with the formation of NSCLC. The presence of the polymorphic marker rs12843803 TG was significantly associated with the degree of lymph node metastases. We analysed the tumor microenvironment and showed that the degree of CD8 infiltration into the tumor stroma was significantly higher in patients with rs5935436 CT genotype.

**CONCLUSION:** This study confirmed an association between hereditary increased TLR7 gene expression, risk of non-small cell lung cancer and tumor microenvironment. This data can be useful for the further research on anticancer therapy focused on TLR7 gene function.

**KEY WORDS:** NSCLC, TLR7, POLYMORPHISM, CD8 + LYMPHOCYTES, TUMOR MICROENVIRONMENT

## 10 POPIS LITERATURE

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013;63(1):11–30.
2. Jakobsen E, Olsen KE, Bliddal M, Hornbak M, Persson GF, Green A. Forecasting lung cancer incidence, mortality, and prevalence to year 2030. *BMC Cancer.* 2021;21(1):985.
3. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine.* 2011;32: 605–44.
4. Didkowska J, Wojciechowska U, Mańczuk M, Lobaszewski J. Lung cancer epidemiology: Contemporary and future challenges worldwide. *Ann Transl Med.* 2016;4(8):150-61.
5. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014. Bilten br. 39. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2016.
6. Nielsen LS, Bælum J, Rasmussen J, Dahl S, Olsen KE, Albin M i sur. Occupational asbestos exposure and lung cancer - A systematic review of the literature. *Archives of Environmental & Occupational Health,* 69:4, 191-206,
7. Valery L, Anke O, Inge KK, Johannes B. Effectiveness of smoking cessation interventions among adults: A systematic review of reviews. *European Journal of Cancer Prevention.* 2008;17:535–44.
8. Keith RL, Miller YE. Lung cancer chemoprevention: Current status and future prospects. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2013;10:334–43.
9. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Everett B, Libby P, Glynn R i sur. Effect of interleukin-1 $\beta$  inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2017; 390: 1833–42.
10. Veronesi G, Maisonneuve P, Bellomi M, Rampinelli C, Durlì I, Bertolotti R i sur. Estimating overdiagnosis in low-dose computed tomography screening for lung cancer: A cohort study. *Annals of Internal Medicine.* 2012;157(11):776–84.
11. Van den Bergh KAM, Essink-Bot ML, Borsboom GJJM, Scholten ET, Van Klaveren RJ, De Koning HJ. Long-term effects of lung cancer computed tomography screening on health-related quality of life: the NELSON trial. *European Respiratory Journal.* 2011;38:154-61.

12. Bianchi F, Nicassio F, Marzi M, Belloni E, Dall'Olio V, Bernard L i sur. A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. *EMBO Molecular Medicine*. 2011;3(8):495–503.
13. Yeung SCJ, Habra MA, Thosani SN. Lung cancer-induced paraneoplastic syndromes. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2011;17:260–8.
14. Callister MEJ, Baldwin DR, Akram AR, Barnard S, Cane P, Draffan J i sur. British thoracic society guidelines for the investigation and management of pulmonary nodules. *Thorax*. 2015;70:1–54.
15. Annema JT, van Meerbeeck JP, Rintoul RC, Doooms C, Deschepper E, Dekkers OM i sur. Mediastinoscopy vs endosonography for mediastinal nodal staging of lung cancer: A randomized trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2010;304(20):2245–52.
16. Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJF, Lantuejoul S, Papotti M, Rintoul RC i sur. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer*. 2012;76:1–18.
17. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C i sur. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2018;29:192–237.
18. Inamura K. Clinicopathological characteristics and mutations driving development of early lung adenocarcinoma: Tumor initiation and progression. *Int J Mol Sci*. 2018;19:1259-76.
19. Cagle PT, Allen T Craig, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Borczuk AC i sur. Precision molecular pathology of lung cancer. 2nd ed. Houston;Springer:2018.
20. Hasleton PS, Flieder DB, Spencer H. Spencer's pathology of the lung. Sixth ed. Cambridge; Cambridge University Press:2012. p 1608.
21. De Ruyscher D, Faivre-Finn C, Moeller D, Nestle U, Hurkmans CW, le Péchoux C i sur. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) recommendations for planning and delivery of high-dose, high precision radiotherapy for lung cancer. *Radiotherapy and Oncology*. 2017;124(1):1–10.
22. Aupérin A, le Péchoux C, Rolland E, Curran WJ, Furuse K, Fournel P i sur. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non - small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(13):2181–90.
23. Rueth NM, Andrade RS. Is VATS Lobectomy Better: Perioperatively, Biologically and Oncologically? *Ann Thorac Surg* 2010;89:2107–11.

24. Pfannschmidt J, Dienemann H. Surgical treatment of oligometastatic non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010;69:251–58.
25. Predina JD, Kunkala M, Aliperti LA, Singhal AK, Singhal S, Thorac A i sur. Sleeve lobectomy: current indications and future directions. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;16:310–18.
26. Arriagada R, De Radiomedic-Ina I, Santiago C; Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T i sur. Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2004;350:351–60.
27. Forde PM, Chaft JE, Smith KN, Anagnostou V, Cottrell TR, Hellmann MD i sur. Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(21):1976–86.
28. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R i sur. The IASLC lung cancer staging project: Proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *Journal of Thoracic Oncology*. 2007;8:706–14.
29. Zhao Y, Liu J, Cai X, Pan Z, Liu J, Yin W i sur. Efficacy and safety of first line treatments for patients with advanced epidermal growth factor receptor mutated, non-small cell lung cancer: Systematic review and network meta-analysis. *BMJ* 2019;367:l5460.
30. Ratcliffe MJ, Sharpe A, Midha A, Barker C, Scott M, Scorer P i sur. Agreement between programmed cell death ligand-1 diagnostic assays across multiple protein expression cutoffs in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(14):3585–91.
31. Booth CM, Shepherd FA, Peng Y, Darling GE, Li G, Kong W i sur. Adoption of adjuvant chemotherapy for non-small-cell lung cancer: A population-based outcomes study. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(21):3472–8.
32. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V i sur. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAiL. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27:1227–34.
33. Kelly K, Altorki NK, Eberhardt WEE, O'Brien MER, Spigel DR, Crinò L i sur. Adjuvant erlotinib versus placebo in patients with stage IB-IIIa nonsmall-cell lung cancer (RADIANT): A randomized, double-blind, Phase III trial. *J Clin Oncol*. 2015; 33:4007-4014.
34. Soria JC, Felip E, Cobo M, Lu S, Syrigos K, Lee KH i sur. Afatinib versus erlotinib as second-line treatment of patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung (LUX-

- Lung 8): An open-label randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(8):897–907.
35. Camidge DR, Kim HR, Ahn M-J, Yang JC-H, Han J-Y, Lee J-S i sur. Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(21):2027–39.
  36. Wakelee HA, Dahlberg SE, Keller SM, Tester WJ, Gandara DR, Graziano SL i sur. Adjuvant chemotherapy with or without bevacizumab in patients with resected non-small-cell lung cancer (E1505): an open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(12):1610–23.
  37. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*. 2011;3:920–40.
  38. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*. 2006;13:816–25.
  39. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140:805–20.
  40. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:461-69.
  41. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2011;378:1015–26.
  42. O’Neill LAJ, Hennessy EJ, Parker AE. Targeting Toll-like receptors: Emerging therapeutics? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9:293–307.
  43. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014;510:92–101.
  44. Chatterjee S, Crozet L, Damotte D, Iribarren K, Schramm C, Alifano M i sur. TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*. 2014;74(18):5008–18.
  45. Dajon M, Iribarren K, Cremer I. Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. *Immunobiology*. 2017;222:89–100.
  46. Koltsida O, Karamnov S, Pyrillou K, Vickery T, Chairakaki AD, Tamvakopoulos C i sur. Toll-like receptor 7 stimulates production of specialized pro-resolving lipid mediators and promotes resolution of airway inflammation. *EMBO Molecular Medicine*. 2013;5(5):762–75.
  47. Dajon M, Iribarren K, Cremer I. Dual roles of TLR7 in the lung cancer microenvironment. *OncoImmunology*. 2015;4(3):1–3.



48. Cherfils-Vicini J, Platonova S, Gillard M, Laurans L, Validire P, Caliandro R i sur. Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(4):1285–97.
49. Zhou SX, Li FS, Qiao YL, Zhang XQ, Wang ZD. Toll-like receptor 5 agonist inhibition of growth of A549 lung cancer cells in vivo in a MyD88 dependent manner. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13(6):2807–12.
50. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 2002;20:197–216.
51. Smole U, Kratzer B, Pickl WF. Soluble pattern recognition molecules: Guardians and regulators of homeostasis at airway mucosal surfaces. *European Journal of Immunology*. 2020;50:624–42.
52. Ranjan P, Bowzard JB, Schwerzmann JW, Jeisy-Scott V, Fujita T, Sambhara S. Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity. Vol. 15, *Trends in Molecular Medicine*. 2009;15:359–68.
53. Carroll MC and Janeway CA. Innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 1999;11:11–12.
54. Bhattacharya J, Westphalen K. Macrophage-epithelial interactions in pulmonary alveoli. *Seminars in Immunopathology*. 2016;38:461–9.
55. Hartl D, Tirouvanziam R, Laval J, Greene CM, Habiel D, Sharma L i sur. Innate Immunity of the Lung: From Basic Mechanisms to Translational Medicine. *Journal of Innate Immunity*. 2018;10:487–501.
56. Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology*. 2018.;223:383–96.
57. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors *Subscribe to Journal. Nature Immunology*. 2010;115:373-84.
58. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454:428–435.
59. McClure R, Massari P. TLR-dependent human mucosal epithelial cell responses to microbial pathogens. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:396-410.
60. Miggin SM, Pålsson-McDermott E, Dunne A, Jefferies C, Pinteaux E, Banahan K i sur. NF- $\kappa$ B activation by the Toll-IL-1 receptor domain protein MyD88 adapter-like is regulated by caspase-1. *PNAS*. 2007;104:9:3372-77.
61. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2004;31(3):358–64.

62. Soong G, Reddy B, Sokol S, Adamo R, Prince A. TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(10):1482–9.
63. Zhang Y-B, He F-L, Fang M, Hua T-F, Hu B-D, Zhang Z-H i sur. Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. *Molecular Biology Reports*. 2009;36:36:1475–1481.
64. Schaefer TM, Desouza K, Fahey JV, Beagley KW, Wira CR. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology*. 2014;112(3):428–36.
65. Li ZJ, Sohn KC, Choi DK, Shi G, Hong D, Lee HE i sur. Roles of TLR7 in activation of NF-kappaB signaling of keratinocytes by imiquimod. *PLoS One* (2013) 8(10):e77159.
66. Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X i sur. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol*. 2005;174:1259–68.
67. Chi H, Li C, Zhao FS, Zhang L, Bun Ng T, Jin G, Sha O. Anti-tumor Activity of Toll-Like Receptor 7 Agonists. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 304.
68. Miller RL, Meng TC, Tomai MA. The Antiviral Activity of Toll-Like Receptor 7 and 7/8 Agonists. *Drug News Perspect* 2008;21(2):69.
69. Singh M, Khong H, Dai Z, Huang X-F, Jennifer A Wargo AJ, Cooper ZA i sur. Effective innate and adaptive antimelanoma immunity through localized TLR7/8 activation. *J Immunol Baltim Md* 2014;193(9):4722-31.
70. Tockman MS, Anthonisen NR, Wright EC, Donithan MG. Airways obstruction and the risk for lung cancer. *Annals of Internal Medicine*. 1987;106(4):512–8.
71. Houghton AM, Mouded M, Shapiro SD. Common origins of lung cancer and COPD. *Nat Med*. 2008;14(10):1023-4.
72. Zhang F, Ying L, Jin J, Chen K, Zhang N, Wu J i sur. The C-reactive protein/albumin ratio predicts long-term outcomes of patients with operable non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017 Jan 31; 8(5): 8835–42.
73. David H. Rudolf Virchow and Modern Aspects of Tumor Pathology. *Pathology Research and Practice*. 1988;183(3):356–64.
74. Wherry EJ. T cell exhaustion *Subscribe to Journal. Nature Immunology*. 2011;12(6): 492-99.
75. Wilkinson TMA. Immune checkpoints in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Rev* 2017; 26: 170045.

76. Mark NM, Kargl J, Busch SE, Yang GHY, Metz HE, Zhang H i sur. Chronic obstructive pulmonary disease alters immune cell composition and immune checkpoint inhibitor efficacy in non-small cell lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2018;197(3):325–36.
77. Suhir H, Etzioni A. The Role of Toll-Like Receptor Signaling in Human Immunodeficiencies. *Clinic Rev Allerg Immunol* (2010) 38:11–19.
78. Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Ge J, Xiang B i sur. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer* 18, 10 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0928-4>.
79. Shao C, Yang F, Miao S, Liu W, Wang C, Shu Y i sur. Role of hypoxia-induced exosomes in tumor biology. *Mol Cancer*. 2018;17(1):120.
80. Haderk F, Schulz R, Iskar M, Cid LL, Worst T, Willmund KV i sur. Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes. *Sci Immunol*. 2017;2(13):eaah5509,
81. Abrusiewicz K, Li X, Wei J, Hashimoto Y, Marisettey AL, Ott M i sur. Glioblastoma stem cell-derived exosomes induce M2 macrophages and PD-L1 expression on human monocytes. *Oncoimmunology*. 2018;7(4):e1412909.
82. Chang ZL. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm. Res*. 2010;59:791–808.
83. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):57-63.
84. Rybicki BA, Maliarik MJ, Malvitz E, Sheffer RG, Major M, Popovich J Jr, Iannuzzi MC. The influence of T cell receptor and cytokine genes on sarcoidosis susceptibility in African Americans. *Hum Immunol*. 1999;60(9):867-74.
85. Wooding SP, Watkins WS, Bamshad MJ, Dunn DM, Weiss RB, Jorde LB. DNA sequence variation in a 3.7-kb noncoding sequence 5' of the CYP1A2 gene: implications for human population history and natural selection. *Am J Hum Genet*. 2002;71(3):528-542.
86. Väli U, Brandström M, Johansson M, Ellegren H. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC genetics*. 2008(22);9:8.
87. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Research*. 1998;8(12):1229–31.
88. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Samps N, Graves T i sur. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature*. 2008 May 1; 453(7191): 56–64.

89. Sunyaev S, Ramensky V, Bork P. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends in Genetics*. 2000;16(5):198–200.
90. The International HapMap Project. The International HapMap Consortium. *Nature*. 2003; (426):789-96.
91. Casanova JL, Abel L, Quintana-Murci L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: Natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annual Review of Immunology*. 2011;29:447–91.
92. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ i sur. A Common Dominant TLR5 Stop Codon Polymorphism Abolishes Flagellin Signaling and Is Associated with Susceptibility to Legionnaires' Disease. *Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(10):1563–72.
93. Kutikhin AG. Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk. *Human Immunology*. 2011;72(11):1095–116.
94. Lasker MV, Nair SK. Intracellular TLR Signaling: A Structural Perspective on Human Disease. *The Journal of Immunology*. 2006;177(1):11–6.
95. Echizen K, Hirose O, Maeda Y, Oshima M. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways. *Cancer Sci*. 2016; 107:391– 97.
96. Braber S, Thio M, Blokhuis BR, Henricks PAJ, Koelink PJ, Kormelink TG i sur. An association between neutrophils and immunoglobulin free light chains in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2012;185(8):817–24.
97. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: Complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental Cell*. 2010;18(6):884–901.
98. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. *International Journal of Cancer*. 2007;121;2373–80.
99. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454:435-44.
100. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M i sur. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacology and Therapeutics*. 2014;141:125–39.
101. Moghaddam SJ, Li H, Cho SN, Dishop MK, Wistuba II, Ji L i sur. Promotion of lung carcinogenesis by chronic obstructive pulmonary disease-like airway inflammation in a K-ras-

- induced mouse model. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2009;40(4):443–53.
102. Gutierrez-Arcelus M, Rich SS, Raychaudhuri S. Autoimmune diseases-connecting risk alleles with molecular traits of the immune system. *Nature Reviews Genetics*. 2016;16:160–74.
  103. Muller AJ and Scherle AP. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*. 2006;6:613–65.
  104. Rodriguez PC and Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.* 2008;222:180–191.
  105. Dolcetti LE, Peranzoni S, Marigo UI, Fernandez Gomez A, Mesa C, Geilich M i sur. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40: 22–35.
  106. Diao Y, Wang X, Wan Y, Zhong J, Gao D, Liu Y i sur. Antitumor activity of a novel small molecule TLR7 agonist via immune response induction and tumor microenvironment modulation. *Oncology Reports*. 2016; 35: 793-800.
  107. Singh M, Khong H, Dai Z, Huang XF, Wargo JA, Cooper ZA, Vasilakos JP i sur. Effective innate and adaptive antimelanoma immunity through localized TLR7/8 activation. *J Immunol* 2014;193:4722-31.
  108. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S i sur. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 2005;202:1131–9.
  109. Pawar RD, Ramanjaneyulu A, Kulkarni OP, Lech M, Segerer S, Anders HJ. Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:1721–31.
  110. Ochi A, Graffeo CS, Zambirinis CP, Rehman A, Hackman M, Fallon N i sur. Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans. *J Clin Invest*. 2012;122:4118–29.
  111. Baglivo S, Bianconi F, Metro G, Gill A, Tofanetti FR, Bellezza G i sur. Higher TLR7 Gene Expression Predicts Poor Clinical Outcome in Advanced NSCLC Patients Treated with Immunotherapy. *Genes*. 2021;12(7):992.
  112. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2001;31:3388–93.

113. Hattermann K, Picard S, Borgeat M, Leclerc P, Pouliot M, Borgeat P. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B<sub>4</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub> and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J.* 2007;21:1575–85
114. Averett DR, Fletcher SP, Li W, Webber SE, Appleman JR. The pharmacology of endosomal TLR agonists in viral disease. *Biochem Soc Trans.* 2007;35:1468–72.
115. Huang B, Zhao J., Unkeless JC, Feng ZH, Xiong H. TLR signaling by tumor and immune cells: A double-edged sword. *Oncogene.* 2008;27:218–224.
116. De Torres JP, Marín JM, Casanova C, Cote C, Carrizo S, Cordoba-Lanus E i sur. Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Incidence and predicting factors. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(8):913–9.
117. Rich AM, Hussaini HM, Venkata P, Parachuru B, Seymour GJ. Toll-like receptors and cancer, particularly oral squamous cell carcinoma. *Front Immunol.* 2014;5(9):464.
118. Karin M. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(5):1–14.
119. Stathopoulos GT, Sherrill TP, Han W, Sadikot RT, Yull FE, Blackwell TS i sur. Host Nuclear Factor- K B Activation Potentiates Lung Cancer Metastasis. *Mol Cancer Res.* 2008;6(3):364–71.
120. Muller-Hermelink N, Braumuller H, Pichler B, Wieder T, Mailhammer R, Schaak K i sur. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell.* 2008;13:507–18.
121. Murohashi I, Hoang T. Interferon-gamma enhances growth factor-dependent proliferation of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood.* 1991;78:1085–95.
122. Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR i sur. IFN-gamma-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest.* 2017;127:2930–40.
123. Wang D, Precopio M, Lan T, Yu D, Tang JX, Kandimalla ER, Agrawal S. Antitumor activity and immune response induction of a dual agonist of Toll-like receptors 7 and 8. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(6):1788-97.
124. Koga-Yamakawa E, Dovedi SJ, Murata M, Matsui H, Leishman AJ, Bell J i sur. Intratracheal and oral administration of SM-276001: a selective TLR7 agonist, leads to antitumor efficacy in primary and metastatic models of cancer. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2013; 132(3):580-90.
125. Le Mercier I, Poujol D, Sanlaville A, Sisirak V, Gobert M, Durand I i sur. Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment. *Cancer Res.* 2013 73(15):4629-40.

126. Apetoh L, Smyth MJ, Drake CG, Abastado RN, Ron NA, Ayyoub M i sur. Consensus nomenclature for CD8<sup>+</sup> T cell phenotypes in cancer. *Oncoimmunology*. 2015;4(4):e998538.
127. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskiene B, Miliauskas S, Bajoriunas V i sur. The prognostic influence of tumor infiltrating Foxp3(+)CD4(+), CD4(+) and CD8(+) T cells in resected non-small cell lung cancer. *J Inflamm*. 2015;12:63-72.
128. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ i sur. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007;450(7171):903–7.
129. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(5):275–87
130. Jackute J, Žemaitis M, Pranys D, Šitkauskiene B, Miliauskas S, Bajoriunas V i sur. Distribution of CD4(+) and CD8(+) T cells in tumor islets and stroma from patients with non-small cell lung cancer in association with COPD and smoking. *Medicina (Kaunas)*. 2015;51(5):263-71.
131. Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y, Suzuoki M, Oshikiri T, Nakakubo Y i sur. Concurrent infiltration by CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer* 2006;94(2):275–80.
132. Tian C, Lu S, Fan Q, Zhang W, Jiao S, Zhao X i sur. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8 (+) or CD3 (+) T lymphocytes and interleukin-2 expression in radically resected non-small cell lung cancer. *Chin Med J*. 2015;128(1):105–1.
133. Hurkmans DP, Kuipers ME, Smit J, van Marion R, Mathijssen RHJ, Postmus PE i sur. Tumor mutational load, CD8<sup>+</sup> T cells, expression of PD-L1 and HLA class I to guide immunotherapy decisions in NSCLC patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(5):771–77.
134. Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y MD, Naito Y, Mizuno T i sur. Predominant infiltration of macrophages and CD8<sup>+</sup> T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2008;6:1387-95.
135. Mazzaschi G, Facchinetti F, Missale G, Canetti D, Madeddu D, Zecca A i sur. The circulating pool of functionally competent NK and CD8<sup>+</sup> cells predicts the outcome of anti-PD1 treatment in advanced NSCLC. *Lung cancer*. 2019;127:153-63.
136. Dajon M, Iribarren K, Petitprez F, Marmier S, Lupo A, Gillard M i sur. Toll like receptor 7 expressed by malignant cells promotes tumor progression and metastasis through the recruitment of myeloid derived suppressor cells. *Oncoimmunology*. 2019; 8(1): e1505174.
137. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M i sur. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a

- granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007; 25(18):2546-53.
138. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res*. 2004;64(17):6337–43.
139. Liotti F, Marotta M, Sorriento D, Pone E, Morra F, Melillo RM i sur. Toll-Like Receptor 7 Mediates Inflammation Resolution and Inhibition of Angiogenesis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers* 2021;13:740-58.
140. Garcia J, Hurwitz HI, Sandler AB, Miles D, Coleman RL, Deurloo R, Chinot OL. Bevacizumab (Avastin(R)) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat. Rev*. 2020;86: 102017.
141. Vinod N, Hwang D, Azam SH, Van Swearingen AED, Wayne E, Fussell SC i sur. High-capacity poly(2-oxazoline) formulation of TLR 7/8 agonist extends survival in a chemo-insensitive, metastatic model of lung adenocarcinoma. *Sci Adv*. 2020;6:eaba5542.



## 11 ŽIVOTOPIS

Fedža Džubur rođen je 11.04.1985. u Dubrovniku gdje je završio osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Diplomirao je 2009. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U razdoblju od srpnja 2009. do studenog 2010. godine odrađuje pripravnički staž u KBC-u Zagreb. Iste godine u listopadu polaže državni ispit te započinje specijalizaciju iz interne medicine u KBC-u Zagreb. Za vrijeme specijalizacije završio je poslijediplomski studij “Bolesti plućne cirkulacije i plućna hipertenzija” na Sveučilištu u Bologni. Specijalistički ispit je položio 2015. godine i od tada radi kao odjelni liječnik u Odjelu Intenzivnog liječenja Klinike za plućne bolesti Jordanovac. Subspecijalistički ispit iz pulmologije polaže 2020.godine. Nacionalni kordinator je za transplantaciju pluća od 2012. godine. Aktivno je sudjelovao u osnivanju i provedbi programa transplantacije pluća u Hrvatskoj. Tijekom 2019. i 2020. godine je boravio u Klinici AKH u Beču na edukaciji za transplantaciju pluća kao transplantacijski pulmolog. Član je Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ), Hrvatskog torakalnog društva (TORAKS) te Europskog respiratornog društva (ERS). Autor je i koautor na nekoliko radova objavljenih u indeksiranim publikacijama, aktivno sudjeluje na znanstvenim skupovima, govori engleski i njemački jezik.