

# Analiza regulacije imunosnog odgovora izazvanog stanicama adenokarcinoma pluća s mutacijom gena EGFR

---

Harabajsa, Suzana

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:132276>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Suzana Harabajska

**Analiza regulacije imunskog odgovora  
izazvanog stanicama adenokarcinoma  
pluća s mutacijom gena *EGFR***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Suzana Harabajska

**Analiza regulacije imunosnog odgovora  
izazvanog stanicama adenokarcinoma  
pluća s mutacijom gena *EGFR***

DOKTORSKI RAD

Mentorice: Petra Korać i Silvana Smojver-Ježek

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Suzana Harabajsa

**Analysis of immune response regulation  
induced by lung adenocarcinoma cells  
with *EGFR* gene mutation**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors: Petra Korać and Silvana Smojver-Ježek

Zagreb, 2024.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Odjelu za pulmološku citologiju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, i u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti dr. Fran Mihaljević, pod vodstvom prof. dr. sc. Petre Korać kao prve mentorice i doc. dr. sc. Silvane Smojver-Ježek kao druge mentorice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## INFORMACIJE O PRVOJ MENTORICI

Prof. dr. sc. Petra Korać završila je diplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu 2002. godine, gdje je 2007. godine i doktorirala u području imunobiologije i fiziologije. Godine 2009. završila je stručni magisterij Upravljanje u znanosti na Medicinskom fakultetu/Školi narodnog zdravlja „Andrija Štampar“. Od svibnja 2004. godine bila je zaposlena kao znanstveni novak-asistent/viši asistent Medicinskog fakulteta u Zagrebu s radnim mjestom u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KB Merkur. Od rujna 2012. godine zaposlena je na Zavodu za molekularnu biologiju, Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta gdje trenutno radi kao redovni profesor. Predaje na kolegijima „Genomi“, „Medicinska genetika“, „Molekularna dijagnostika“, „Metode istraživanja u molekularnoj biologiji“, „Razvoj znanstvene misli u biologiji“, „Rezistencija virusa na lijekove“, „Molekularna dijagnostika neoplazmi“, „Biology 1“ i „Biology 2“. Predavač je i na Zdravstvenom Veleučilištu u Zagrebu i Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje u istraživanjima europskih i hrvatskih projekata u području biologije tumora, molekularne dijagnostike, medicinske genetike i infektivnih bolesti. Do sada je objavila 40 znanstvenih i 11 stručnih radova i sudjelovala u istraživanjima koja su rezultirala s 84 izlaganja na znanstvenim i stručnim skupovima. Bila je mentor velikog broja završnih i diplomskih radova na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i na Zdravstvenom veleučilištu. Usavršavala se na znanstvenim ustanovama u Njemačkoj, Nizozemskoj, Francuskoj, Velikoj Britaniji i Gani. Znanstvena je suradnica u polju kliničkih medicinskih znanosti te znanstvena savjetnica u polju biologije.

## INFORMACIJE O DRUGOJ MENTORICI

Viša znanstvena suradnica dr. sc. Silvana Smojver-Ježek diplomirala je 1986. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na istom fakultetu magistrirala je 1999. godine, a doktorirala 2009. godine.

Za vrijeme liječničkog staža 1986. do 1987. godine pohađala je znanstveni poslijediplomski studij Medicinska citologija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 1987. do 1991. godine radila je kao liječnik opće medicine u Domu zdravlja Maksimir, a od 1990. godine i u Citološkom laboratoriju Klinike za plućne bolesti Jordanovac. Od 1992. do 1995. godine bila je na specijalizaciji iz medicinske citologije za Kliniku za plućne bolesti Jordanovac. Kao liječnik specijalist medicinske/kliničke citologije radi u Citološkom laboratoriju Klinike za plućne bolesti Jordanovac od 1995. godine do danas (Odjel za pulmološku citologiju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb). Od 2004. godine voditeljica je istog Odjela. Priznavanje naziva primarijus stekla je 2008. godine.

U naslovo znanstveno-nastavno zvanje docentice za potrebe poslijediplomskih studija Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu izabrana je 2013. godine. Godine 2015. izabrana je u znanstveno zvanje višeg znanstvnog suradnika u području biomedicine i zdravstva, polje medicinske znanosti, a 2018. godine reizabrana je u naslovo znanstveno-nastavno zvanje docentice za potrebe poslijediplomskih studija Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu izabrana je u naslovnog višeg predavača 2012. godine, a 2018. godine u naslovno znanstveno zvanje docentice.

Predaje na poslijediplomskim studijima Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na tečajevima trajnog usavršavanja, te na studijima Zdravstvenog veleučilišta u Zagrebu. Suradnica je na projektima Ministarstva znanosti i obrazovanja i sporta te mentor studentima. Autorica je ili koautorica 153 rada, kongresnih priopćenja i nastavnih tekstova. U uglednim časopisima indeksiranim u bazama CC i SCIE, te Scopus i Medline objavila je 29 radova i 26 kongresnih sažetaka.

## ZAHVALE

- Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Petri Korać na vođenju kroz poslijediplomski studij i stručnoj pomoći tijekom izrade doktorske disertacije. Posebno joj se zahvaljujem na pruženoj prilici da karcinom pluća sagledam iz jedne drukčije, znanstvene perspektive.
- Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Silvani Smojver-Ježek na savjetima, poticanju i neprekidnoj podršci tijekom mog stručnog i znanstvenog rada.
- Zahvaljujem se kolegicama Pauli Gršković i Valeriji Begić iz Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na stručnoj pomoći i podršci u izradi ovog dokorskog rada.
- Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Snježani Židovec Lepej, dr. sc. Lani Gorenc i dr. sc. Ivani Grgić iz Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti dr. Fran Mihaljević na susretljivosti i stručnoj pomoći u izradi ovog dokorskog rada.
- Zahvaljujem se dr. sc. Matei Zajc Petranović iz Instituta za Antropologiju na suradnji i svim savjetima koji su mi olakšali pisanje ovog dokorskog rada.
- Zahvaljujem se liječnicima i medicinskim sestrama Klinike za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb na susretljivosti i razumjevanju. Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Marku Jakopoviću, doc. dr. sc. Sonji Badovinac i medicinskoj sestri Ivani Lukić Franolić na svim uzorcima bez kojih izrada ovog doktorata ne bi bila moguća.
- Zahvaljujem se svojim kolegicama iz Odjela za pulmološku citologiju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb na razumjevanju.
- Zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci.
- Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima Josipu i Ankici.



**Analiza regulacije imunosnog odgovora izazvanog stanicama adenokarcinoma  
pluća s mutacijom gena *EGFR***

Suzana Harabajsa  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Adenokarcinom pluća jedan je od najčešćih malignih tumora današnjice. Za njega je specifična mutacija gena *EGFR* na temelju koje se dijeli u podskupine za koje su razvijene ciljane terapije. Kao i svi tumori, adenokarcinom pluća uzrokuje imunosni odgovor domaćina promjenama vlastitog transkriptoma, ali i promjenama koje su uzrokovane infekcijom tumorskih stanica virusima, poput one citomegalovirusom (HCMV). Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi potencijalne razlike u imunosnom odgovoru kod podskupina adenokarcinoma pluća sa i bez mutacija u genu *EGFR*, potaknute promjenama transkriptoma tumorskih stanica ili prisutnošću HCMV-a u njima. U skupini adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* utvrđena je značajno povišena ekspresija gena *IL-1 $\beta$*  i *CXCR4* u odnosu na skupinu adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR*. Utvrđena je i značajna povezanost između povišene ekspresije gena *CXCR4* i infekcije tumorskih stanica HCMV-om kod adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR*. Razlike u imunosnom odgovoru između ispitivanih skupina adenokarcinoma pluća nisu nađene.

(80 stranica; 13 slika; 8 tablica; 116 literaturnih navoda; jezik izvornika hrvatski)

**Ključne riječi:** adenokarcinom pluća; *EGFR* mutacije; imunosni odgovor; *IL-1 $\beta$* ; *CXCR4*; citomegalovirus

**Mentorice:** 1. prof. dr. sc. Petra Korać, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb  
2. doc. dr. sc. Silvana Smojver-Ježek, Klinički bolnički centar Zagreb

**Ocjenjivači:** 1. izv. prof. dr. sc. Snježana Židovec Lepej, Klinika za infektivne bolesti  
dr. Fran Mihaljević, Zagreb  
2. prof. dr. sc. Maja Matulić, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb  
3. prof. dr. sc. Marko Jakopović, Klinički bolnički centar Zagreb

**Zamjena:** prof. dr. sc. Slavko Gašparov, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Tema doktorskog rada prihvaćena je 06. svibnja, 2019. godine.

**Analysis of immune response regulation induced by lung adenocarcinoma cells  
with *EGFR* gene mutation**

Suzana Harabajsa  
Faculty of Science  
Department of Biology

Lung adenocarcinoma is one of the most common malignant tumors today. The *EGFR* gene mutations are specific for lung adenocarcinoma, therefore it is divided into subgroups for which targeted therapies have been developed. Like all tumors, lung adenocarcinoma stimulates the host's immune response to changes in its transcriptome and changes caused by viral infection of tumor cells such as cytomegalovirus (HCMV). This study aimed to determine potential differences in the immune response in subgroups of lung adenocarcinomas with and without *EGFR* gene mutations caused by changes in the transcriptome of tumor cells or the presence of HCMV. In the group of lung adenocarcinoma without *EGFR* gene mutations, a significantly elevated expression of *IL-1 $\beta$*  and *CXCR4* genes was found compared to the group of lung adenocarcinoma with *EGFR* gene mutations. A significant association was also determined between elevated *CXCR4* gene expression and HCMV infection of tumor cells in lung adenocarcinoma without *EGFR* gene mutations. No differences were found in the immune response between the analyzed groups of lung adenocarcinoma.

(80 pages; 13 pictures; 8 tables; 116 references; original in Croatian)

**Keywords:** lung adenocarcinoma; EGFR mutations; immune response; *IL-1 $\beta$* ; *CXCR4*; cytomegalovirus

**Supervisors:** 1. full professor Petra Korać, PhD, Faculty of Science, Zagreb  
2. assistant professor Silvana Smojver-Ježek, PhD, University Hospital Centre Zagreb

**Reviewers:** 1. associate professor Snježana Židovec Lepej, PhD, Clinic for Infectious Diseases Dr. Fran Mihaljević, Zagreb  
2. full professor Maja Matulić, PhD, Faculty of Science, Zagreb  
3. full professor Marko Jakopović, PhD, University Hospital Centre Zagreb

**Replacement:** full professor Slavko Gašparov, PhD, Merkur Clinical Hospital, Zagreb

The thesis was accepted on May 6, 2019.

<b>SADRŽAJ</b>	<b>Strana</b>
1. UVOD	1
1.1. Hipoteza i ciljevi doktorskog rada	3
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Karcinom pluća	4
2.1.1. Adenokarcinom pluća	4
2.1.2. Mutacije kod adenokarcinoma pluća	5
2.1.3. Uloga citomegalovirusa u patogenezi karcinoma pluća	10
2.2. Imunosni sustav	12
2.2.1. Citokini	14
2.2.2. Kemokini i kemokinski receptori	14
2.2.3. Tumorsko izbjegavanje imunosnog odgovora	15
2.2.4. Virusno izbjegavanje imunosnog odgovora	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Ispitanici	17
3.2. Uzorci	20
3.3. Metode	21
3.3.1. Izolacija DNA i RNA	21
3.3.2. Analiza razine ekspresije gena koji sudjeluju u imunosnom odgovoru	21
3.3.2.1. Reverzna transkripcija	26
3.3.2.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	27
3.3.2.3. Statistička analiza rezultata	28
3.3.3. Analiza imunosnog odgovora	29
3.3.3.1. Statistička analiza rezultata	29
3.3.4. Analiza infekcije citomegalovirusom	30
3.3.4.1. Analiza prisutnosti DNA citomegalovirusa	30
3.3.4.1.1. Lančana reakcija polimerazom	31
3.3.4.1.2. Statistička analiza rezultata	31

3.3.4.2. Analiza imunosnog odgovora specifičnog za citomegalovirus	31
3.3.4.2.1. Statistička analiza rezultata	32
4. REZULTATI	33
4.1. Ekspresija gena uključenih u regulaciju imunosnog odgovora	33
4.2. Imunosni odgovor ispitanika	38
4.3. Analiza infekcije citomegalovirusom	45
4.3.1. Prisutnost DNA citomegalovirusa	45
4.3.2. Imunosni odgovor specifičan za citomegalovirus	46
5. RASPRAVA	49
6. ZAKLJUČCI	54
7. POPIS LITERATURE	55
8. PRILOG	68
9. ŽIVOTOPIS AUTORA	69

## 1. UVOD

Karcinom pluća predstavlja najčešći oblik karcinoma u muškaraca i treći po učestalosti karcinom kod žena (Travis i sur., 2011.). U Hrvatskoj se godišnje dijagnosticira oko 3000 novih bolesnika s karcinomom pluća (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2019.). Karcinom pluća se klasificira u skupinu karcinoma nemalih stanica (85%) i skupinu karcinoma malih stanica (15%). Unutar skupine karcinoma nemalih stanica, na temelju morfoloških i prema potrebi imunocitokemijskih obilježja stanica razlikuju se adenokarcinomi, karcinomi pločastih stanica, neuroendokrini karcinomi nemalih stanica, karcinomi nemalih stanica s vretenastim ili orijaškim stanicama, te miješani karcinomi nemalih stanica. U slučaju nespecifičnog morfološkog i imunocitokemijskog nalaza, karcinom pluća nemalih stanica se kategorizira kao nespecificiran, odnosno karcinom pluća nemalih stanica bez podtipa. Drugi podtipovi karcinoma pluća nemalih stanica kao što su adenoskvamozni karcinom i sarkomatoidni karcinom su značajno rjeđi (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2021.). Kod svih vrsta karcinoma, uključujući karcinom pluća nemalih stanica, dolazi do nakupljanja specifičnih mutacija koje utječu na rast i širenje karcinoma. Takve mutacije nazivaju se pokretačke (od engl. *driver*) mutacije, a kod karcinoma pluća nemalih stanica to su, između ostalih, aktivirajuće točkaste mutacije ili delecije gena *EGFR* (EGFR, od engl. *epidermal growth factor receptor*) koje uzrokuju kontinuiranu aktivaciju receptora faktora rasta EGF (Murugesan i sur., 2021; Yoneda i sur., 2019.; Mohar i sur., 2016.). One su prisutne kod 12%-15% dijagnosticiranih bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica (Harrison i sur. 2020.; Brčić i sur., 2016.; Mohar i sur., 2016.). Najčešće mutacije su delecije eksona 19 (del19) i točkasta mutacija kodona 858 u eksonu 21 (L858R) koje čine 90% svih mutacija tog gena (Harrison i sur. 2020.; Mohar i sur., 2016.).

U obranu organizma od tumora uključeno je mnoštvo različitih gena i signalnih putova (Medzhitov i Janeway, 2000.). Narušavanje putova stanične signalizacije dovodi do proliferacije, inhibicije apoptoze, migracije tumorskih stanica i angiogeneze. Prisutnost tumora potiče odgovor imunskog sustava u obliku upale. Upala pokreće transkripcijsku aktivaciju brojnih gena poput upalnih citokina i kemokina koji djeluju citotoksično na tumor (Li i sur., 2020.; Ahmed i sur., 2015.). Tumorske stanice također stvaraju i luče citokine i kemokine koji sudjeluju u regulaciji imunskog odgovora

bolesnika na tumor. U slučaju oslabljene obrane imunskog sustava, citokini i kemokini umjesto da potaknu aktivaciju specifičnih gena na uništavanje tumorskih stanica mogu djelovati kao promotori proliferacije tumorskih stanica te poticati njihovu migraciju i angiogenezu (Hughes i Nibbs, 2018.; Zhang i Veeramachaneni, 2022.). U početnim fazama razvoja raznih tumora suprimirani su limfociti koji infiltriraju tumor (TIL, od eng. *tumor infiltrating lymphocytes*), a s razvojem bolesti i oni limfociti T koji su prisutni u perifernoj krvi bolesnika (O'Brien i sur., 2019.). Slična imunosupresijska pojava utvrđena je i kod prirodno ubilačkih stanica (NK, od eng. *natural killer cells*) (Wolf i sur., 2023.; Kidane i sur., 2014.; Raval i sur., 2014.; Nguyen i sur., 2014.).

Promjene imunskog sustava mogu biti potaknute i virusima koji često zaražavaju pacijente s oslabljenim imunskim odgovorom kao dijelom tumorske bolesti (Chen i sur., 2014.; Kim i sur., 2018.). Većina virusnih infekcija ne utječe direktno na nastanak tumora, ali mogu značajno promijeniti mikrookoliš tumorskih stanica i učiniti ga pogodnijim za rast tumora i širenje metastaza (Maussang i sur., 2006.). Kod imunokompromitiranih bolesnika poput onih koji imaju dijagnozu malignih tumora često je prisutna infekcija citomegalovirusom (HCMV, od eng. *human cytomegalovirus*) (Gupta i sur., 2016.). Virus HCMV može ući u stanicu domaćina i u njoj boraviti dugi niz godina zahvaljujući sposobnosti demaskiranja, procesa kojim izbjegava prepoznavanje od strane stanica NK. Virus ne pokazuje patogene svojstva sve do narušavanja regulacije imunskog odgovora koja može biti posljedica ugrađivanja virusne DNA u genom stanice bolesnika. Može utjecati na epigenetičke mehanizme (metilaciju DNA, histonske modifikacije (metilaciju, acetilaciju) i stvaranje malih nekodirajućih molekula RNA) što posljedično uzrokuje i promjene u ekspresiji gena, replikaciji DNA i utječe na stabilnost genoma domaćina (Söderberg-Nauclér, 2006.; Michaelis i sur., 2009.). Jedan od načina ulaska HCMV-a u stanicu domaćina je putem receptora EGF-a. Receptor EGF je homeostatski regulator uključen u staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje, što ga čini idealnom metom za virusnu manipulaciju tijekom infekcije (Buehler i sur., 2016.; Fairley i sur., 2002.; Jafferji i sur., 2009.). Virus HCMV je nađen u tumorskim stanicama karcinoma debelog crijeva, karcinoma dojke, mukoepidermoidnog karcinoma, adenokarcinoma prostate, kožnog pločastog karcinoma i karcinoma želuca, te u malom broju karcinoma pluća (Maussang i sur., 2006; Taher i sur., 2013.; Giuliani i sur. 2007.; Gupta i sur., 2016.; Michaelis i sur., 2009.; Jin i sur.; 2014.). Prisutnost HCMV-a u tumorskoj stanici

povezana je s manjom osjetljivosti tumorske stanice na konvencionalne terapije (Fairley i sur., 2002.; Soroceanu i Cobbs, 2011.).

Na temelju dosadašnjih istraživanja vidljiva je povezanost razvoja epitelnih tumora s virusnim infekcijama i promjenama u regulaciji imunskog odgovora domaćina, no ona kod adenokarcinoma pluća nije u potpunosti istražena.

### **1.1. Hipoteza i ciljevi doktorskog rada**

Hipoteza ovog istraživanja je da adenokarcinomi pluća koji imaju mutacije u genu *EGFR* imaju promijenjen dio transkriptoma koji utječe na regulaciju imunskog odgovora domaćina na tumor što predstavlja drugačiji mehanizam razvoja i opstanka tumora od adenokarcinoma pluća koji nemaju mutacije gena *EGFR*.

Specifični ciljevi su:

1. Analizirati razlike u ekspresiji gena uključenih u regulaciju imunskog odgovora kod adenokarcinoma pluća sa i bez mutacija gena *EGFR*,
2. Analizirati razlike u imunskom odgovoru te dvije grupe pacijenata,
3. Analizirati prisutnost infekcije tumorskih stanica HCMV-om,
4. Analizirati imunski odgovor na antigene HCMV-a,
5. Utvrditi potencijalnu povezanost virusne infekcije i promjena u transkriptomu tumorske stanice povezanih s mutacijom *EGFR*-a,
6. Utvrditi razlike u genetskim mehanizmima patogeneze adenokarcinoma pluća sa i bez mutacije gena *EGFR*.

## **2. PREGLED LITERATURE**

### **2.1. Karcinom pluća**

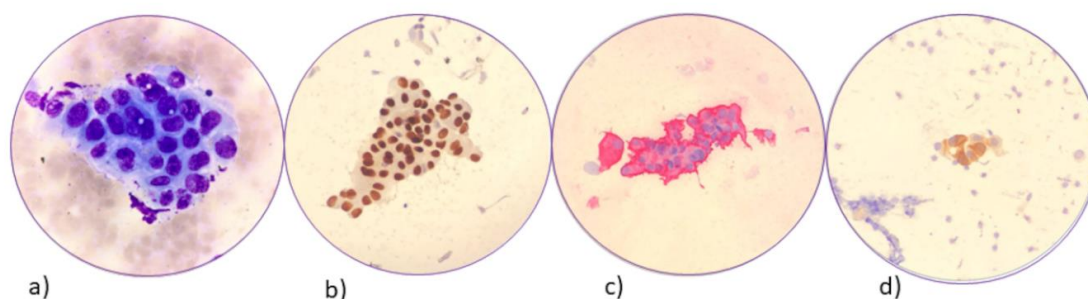
Karcinom pluća uzrokuje 1,69 milijuna smrti godišnje u svijetu što ga čini najčešćim uzrokom smrti među malignim bolestima (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2019.). Unatoč liječenju, gotovo isti broj dijagnosticiranih bolesnika umire svake godine od ove smrtonosne bolesti. Prema bazi podataka GLOBOCAN o incidenciji, prevalenciji i mortalitetu od karcinoma u svijetu, petogodišnje ukupno preživljenje za uznapredovali karcinom pluća u Sjedinjenim Američkim Državama iznosi 18%, u Europi 8,9%, dok je u Republici Hrvatskoj značajno lošije te iznosi 6% (Sung i sur., 2021.; Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2019.). Najveći, vanjski faktor rizika za razvoj karcinoma pluća je pušenje (Malhotra i sur., 2016.; Molina i sur. 2008.). Gotovo 85% bolesnika s karcinomom pluća su pušači i bivši pušači (Travis i sur., 2011.). U dimu cigarete je identificirano 80 različitih kancerogena koji mogu potaknuti promjene u DNA te dovesti do mutacija odgovornih za početak i progresiju karcinoma pluća. Pasivno pušenje, izloženost azbestu, radioaktivnim česticama i onečišćenom zraku, te neki virusi, također povećavaju opasnost od razvoja karcinoma pluća (Malhotra i sur., 2016.; Molina i sur., 2008.). Međutim, oko 15% karcinoma pluća razvije se kod nepušača (Travis i sur., 2011.; Dubin i Griffin, 2020.). Ukoliko se otkrije u ranoj fazi, karcinom pluća je potencijalno izlječiva bolest s petogodišnjim preživljenjem od 66%-82% (Sung i sur., 2021.). Incidencija i mortalitet od karcinoma pluća kod muškaraca stagniraju ili su u blagom padu, dok su kod žena u porastu, što se također dovodi u vezu s porastom prevalencije pušenja kod žena (Sung i sur., 2021.; Janković i sur., 2012.; Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2019.).

#### **2.1.1. Adenokarcinom pluća**

Adenokarcinom pluća najučestaliji je tip karcinoma pluća (40%), a nastaje kao posljedica patoloških promjena na nivou žljezdanih stanica pri čemu stanice karcinoma nekontrolirano rastu i šire se u udaljena tkiva i organe (Alberg i sur., 2016; Inamura,



2017.; Travis i sur., 2011.). Većinom zahvaća periferne dijelove pluća. Morfološke karakteristike dobro diferenciranih stanica adenokarcinoma pluća su obilna citoplazma te ekscentrično položena, okrugla ili ovalna jezgra. Kromatin jezgre je fino granuliran i jednoličan. Moguća je prisutnost trodimenzionalnih nakupina vakuoliziranih stanica (Slika 1). U slučaju prisutnosti niskodiferenciranih stanica, adenokarcinom pluća se razlikuje od ostalih karcinoma pluća ekspresijom proteina TTF-1 (TTF-1, od eng. *thyroid transcription factor-1*), CK7 (CK7, od eng. *cytokeratin 7*) i napsin A (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2021.).

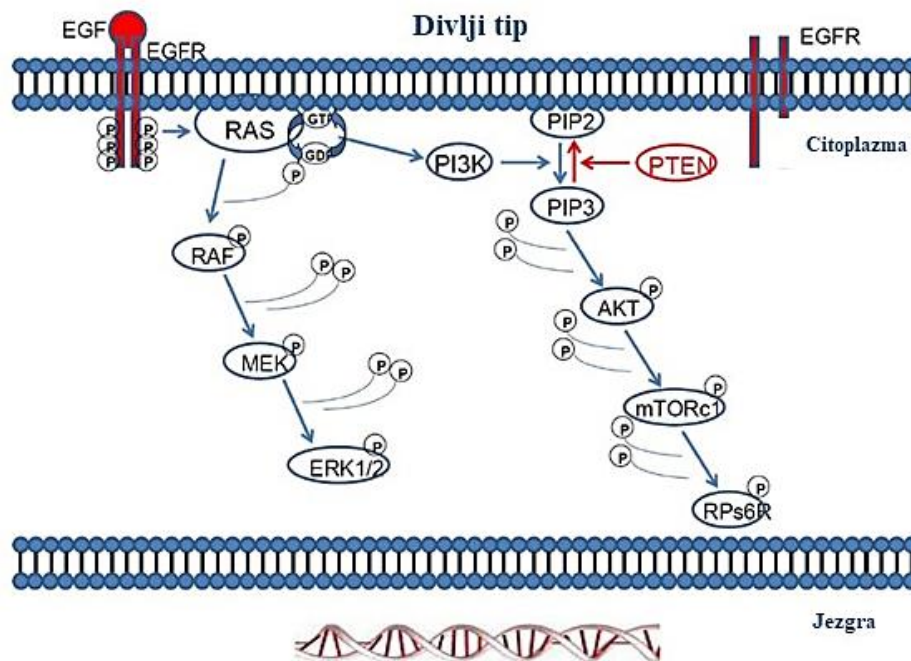


Slika 1. Morfološke karakteristike adenokarcinoma pluća: a) Uniformne stanice u žljezdanim ili papilarnim skupinama. Jezgre su velike i ovalne, ekscentrično položene, fine strukture kromatina, istaknutih nukleola. Citoplazma je umjerena do obilna, bazofilna i pjenasta ili s velikim vakuolama i stvaranjem mucina (MGG, povećanje 1000x); b) Jezgre ekspresiraju TTF-1 (ICK, povećanje 400x); c) Citoplazme ekspresiraju CK7 i d) napsin A (ICK, povećanje 400x). Kratice: MGG, bojenje May-Grünwald Giemsa; ICK, imunocitokemijsko bojenje.

### 2.1.2. Mutacije kod adenokarcinoma pluća

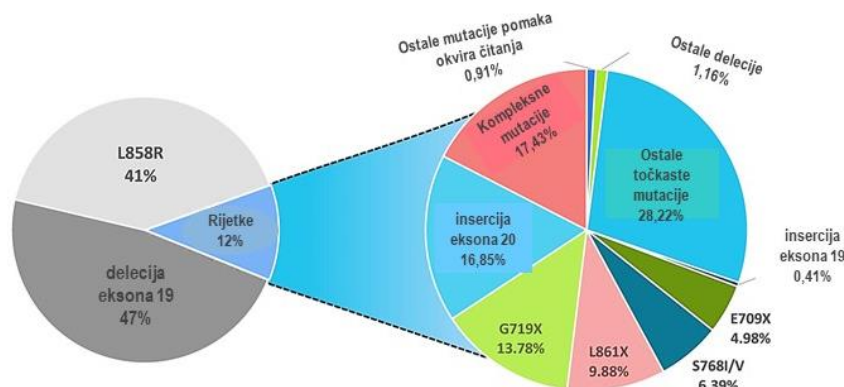
U patogenezu adnokarcinoma pluća često su uključeni signalni putovi rasta koji djeluju preko receptora EGF (Gaur i sur., 2018.). Receptor EGF je član porodice receptora proteinske tirozinske kinaze kojoj pripadaju i ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 i ErbB4/HER4. Receptor EGF je prvi put identificiran kao protein veličine 170 kDa na

membrani epitelnih stanica A431. Aktivnost EGFR-a u zdravim stanicama je strogo kontrolirana, međutim u malignim stanicama geni koji kodiraju receptor, pomoću različitih pokretačkih mutacija izbjegavaju kontrolne mehanizme te utječu na rast i širenje tumora u udaljena mjesta u organizmu. Kod adenokarcinoma to su aktivirajuće točkaste mutacije ili delecije gena *EGFR* (Hutchings i sur., 2018.; Gaur i sur., 2018.). Mutacije povećavaju kinaznu aktivnost EGFR-a što dovodi do aktivacije unutarstanične signalne kaskade kao što je RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT/mTOR, i signalnog puta STAT (de Luca i sur., 2012.). Aktivacija tih putova dovodi do proliferacije, produženog preživljavanja stanica, adhezije, migracije i angiogeneze (Slika 2).



Slika 2. Pojednostavljeni prikaz signalnih putova preko receptora EGF. Signalne putove RAS/RAF/MEK/ERK i RAS/PI3K/mTOR aktiviraju vanjski faktori kao što su faktori rasta i mitogeni. Nakon što se uključe, regrutiraju i aktiviraju proteine potrebne za aktivaciju faktora rasta i drugih signala receptora, kao što su RAF i PI3K. Preuzeto i prilagođeno prema de Luca i sur., 2012.

Najčešće mutacije kod adenokarcinoma pluća su delecije eksona 19 (del19) i točkaste mutacije u eksonu 21 kodona 858. Kod del19 prisutan je gubitak aminokiselinske sekvence leucin-arginin-glutamin-alanin na poziciji 747-750, a kod mutacije u eksonu 21 dolazi do supstitucije arginina sa leucinom (L858R) (Harrison i sur., 2020.). Ove mutacije čine 90% svih mutacija gena *EGFR* (Slika 3). Rijetke mutacije poput točkaste mutacije u eksonu 18 kodona 719 kod koje je glicin zamjenjen serinom, alaninom ili cisteinom (G719X) te insercija i točkasta mutacija u eksonu 20, čine preostalih 10% mutacija gena *EGFR* (Syahrudin i sur., 2018.). Mutacije gena *EGFR* su češće kod ženskog spola i nepušača. Prisutne su kod 10% do 15% bijelaca i 40% Azijaca s adenokarcinomom pluća (Harrison i sur., 2020.). Rijetko se nađu u karcinomu pločastih stanica, karcinomu malih stanica ili drugim malignim epitelnim stanicama (Zhang i sur., 2010.; Freudlsperger i sur., 2011.). Udio mutacija gena *EGFR* kod novo dijagnosticiranih slučajeva karcinoma pluća nemalih stanica za Republiku Hrvatsku iznosi 15,7% (Brčić i sur., 2016.; Mohar i sur., 2016.). Bolesnici koji imaju mutacije gena *EGFR* koje mijenjanju tirozinsko kinaznu domenu proteina, kandidati su za terapiju inhibitorima tirozinske kinaze (Jouida i sur., 2021). S druge strane, prisutnost mutacije T790M u eksonu 20 uzrok je lošeg odgovora adenokarcinoma pluća na terapiju (Brčić i sur., 2016.).



Slika 3. Udio mutacija EGFR-a kod adenokarcinoma pluća. Preuzeto i prilagođeno prema Harrison i sur., 2020.

Prisutnost genskih promjena drugih glavnih pokretačkih gena za karcinom pluća, kao što su *KRAS* (od eng. *Kirsten rat*), *ALK* (od eng. *anaplastic lymphoma kinase*), *ROS1* (od eng. *c-ros oncogene 1*), *BRAF* (od eng. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*), *RET* (od eng. *rearranged during transfection proto-oncogene*) i *ERBB2* (od eng. *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*), nije utvrđena kod slučajeva koji imaju mutaciju u genu *EGFR* (Šutić i sur., 2021.).

Protein *KRAS* je mala GTPaza koja se aktivira izmjenom GDP za GTP. U aktivnom obliku provodi signale putovima RAS/RAF/MEK/ERK i PI3K/AKT (Slika 4). Mutacije *KRAS* u kodonu 12 povezane su s lošijim preživljenjem bolesnika s adenokarcinomom pluća. Pojavljuju se kod približno 20% adenokarcinoma pluća i snažno su povezane s pušenjem (Mohrherr i sur., 2019.; Lindeman i sur., 2018.; Šutić i sur., 2021.; Brčić i sur., 2016.).

Mali postotak adenokarcinoma pluća ima kromosomske aberacije kao što su one koje uključuju gen *ALK*. Gen *ALK* kodira receptorsku tirozinsku kinazu. U tumorima dolazi do inverzije na kratkom kraku drugog kromosoma (2p21 i 2p23) što rezultira fuzijskim onkogenom *EML4-ALK*. Aktivacija *ALK* dovodi do aktivacije brojnih signalnih putova poput RAS/ERK, JAK/STAT i PI3K/AKT (Slika 4). Učestalost translokacije gena *ALK* u bolesnika s adenokarcinomom pluća iznosi 4% do 7% (Šutić i sur., 2021.; Brčić i sur., 2016.; IASLC, 2016.).

Gen *ROS1* kodira receptorsku tirozinsku kinazu ROS, a nalazi se na regiji kromosoma 6q22.1. Kromosomske promjene koje uključuju gen *ROS1* identificirane su u 1% do 2% bolesnika s adenokarcinomom pluća (Šutić i sur., 2021.; Lin i Shaw, 2017.; Bubendorf i sur., 2016.; Fois i sur., 2021.). Vežanjem za EGFR ili TRKA, ROS1 aktivira kombinaciju različitih signalnih komponenti poput fosfolipaze C (*PLC $\gamma$* , od eng. *phosphoinositide phospholipase C*) i putova PI3K/AKT, STAT3, VAV3 i MAPK/ERK (Slika 4).

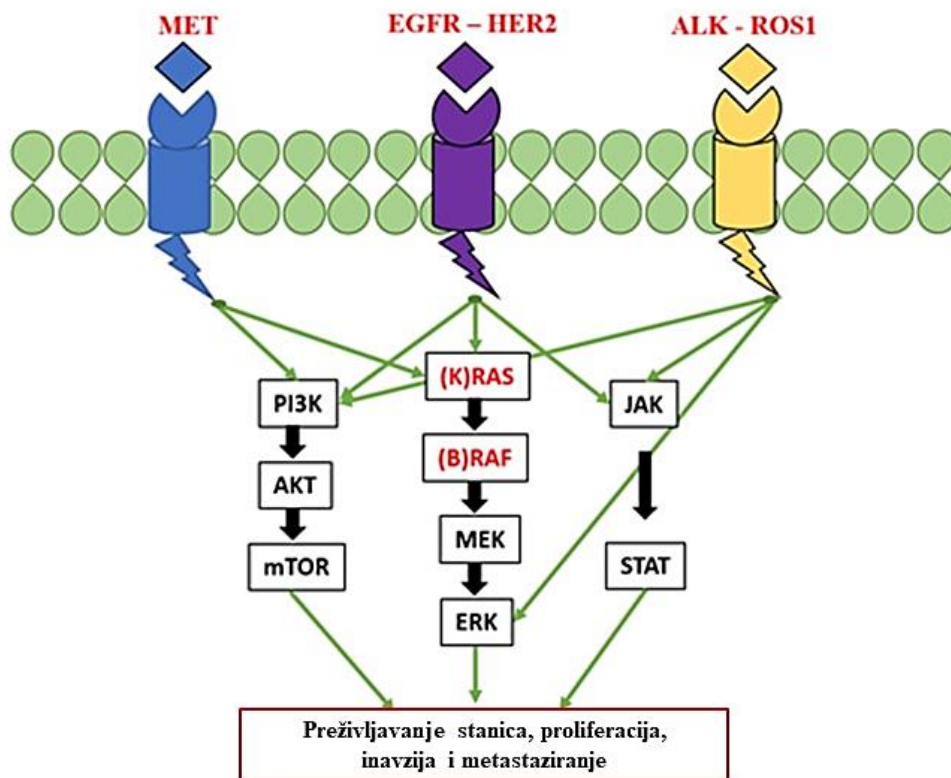
Mutacije gena *BRAF* koje nastaju kao rezultat zamjene glutamina valinom u kodonu 600 (p.V600E) također se mogu naći kod adenokarcinoma pluća i oslabljuju odgovor na terapiju (Lindeman i sur., 2018.; Šutić i sur., 2021.; Yan i sur., 2022.; Wei i sur., 2022.). Djeluju preko signalnog puta RAS/RAF/MEK/ERK (Slika 4).

Prisutnost rearanžmana gena *RET* rezultira deregulacijom i promijenjenom signalizacijom putem kinaze RET. Najčešći partneri fuzije proteina RET su KIF5B,

NCOA4 i CCDC6, a nalaze se u 1% do 2% adenokarcinoma pluća (Lindeman i sur., 2018.; Šutić i sur., 2021.; Fois i sur., 2021.).

Gen *ERBB2*, često se naziva i *HER2* (od eng. *human epidermal growth factor receptor 2*), aktivira signalne putove MAPK, PI3K/AKT, PLC $\gamma$ , PLC i STAT (Slika 4). Aktivacijom signalnih putova, ove mutacije uzrokuju proliferaciju tumorskih stanica, inhibiciju apoptoze, migraciju u udaljena tkiva i organe te angiogenezu.

U približno 45% adenokarcinoma pojavljuju se inaktivirajuće mutacije gena za tumorski supresor *TP53* i obično su povezane s transverzijama G>T i C>A. Put prijenosa staničnih signala posredovan s p53, uključen je u regulaciju 160 gena (Sun i sur., 2020.). Tumorski supresor p53 sprečava replikaciju oštećene DNA i osigurava vrijeme potrebno za njen popravak. Kod neuspješnog popravka, p53 zaustavlja stanični ciklus, potiče popravak oštećene DNA ili, ako je oštećenje veliko, potiče apoptozu (Liu i sur., 2019.). Mutacije u genu *TP53* rezultiraju gubitkom kontrole stanične proliferacije, što može biti dio karcinogeneze. U signalnom putu p53, onkoprotein MDM2 (MDM2, od eng. *mouse double minute 2*) veže se na p53 kako bi formirao kompleks oligodimera za regulaciju aktivnosti p53. Vezanje MDM2 inhibira transaktivaciju posredovanu s p53, potiče inhibiciju stanične proliferacije i indukciju apoptoze (Miliani de Marval i Zhang, 2011.). Ostali faktori uključeni u patogenezu adenokarcinoma pluća uključuju aktivaciju telomeraze i izbjegavanje imunog odgovora domaćina.



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz signalnih putova koji uključuju gene *KRAS*, *BRAF*, *HER2*, *ALK* i *ROSI* kod karcinoma pluća. Preuzeto i prilagođeno prema Fois i sur., 2021.

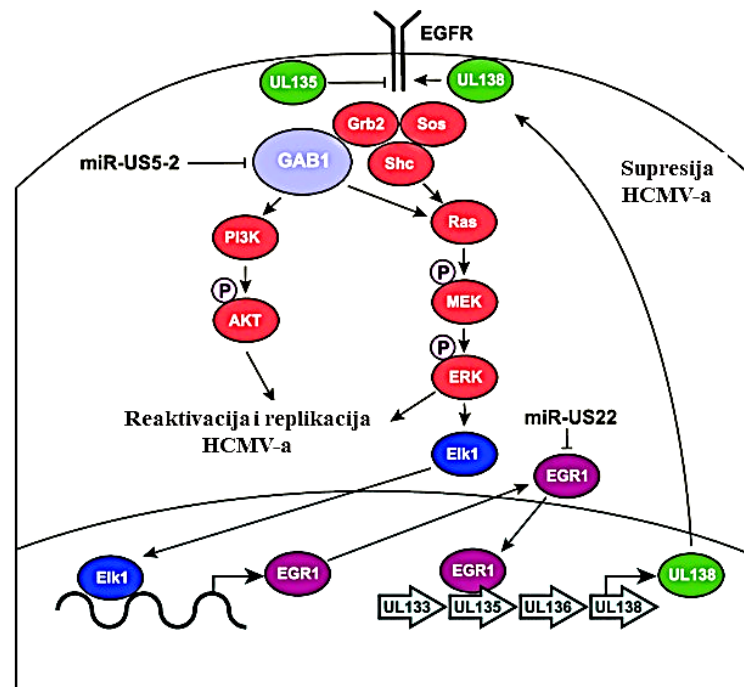
### 2.1.3. Uloga citomegalovirusa u patogenezi karcinoma pluća

Citomegalovirus ili ljudski herpesvirus 5 (HHV5, od eng. *human herpesvirus 5*), je DNA-virus iz porodice herpes virusa. Virus je ovalne građe, ima 16 identičnih strana te podsjeća na oblik ikosaedra. Promjer HCMV-a se kreće od 150 do 200 nm. Genom HCMV-a je linearan i nesegmentiran, a predstavlja jedan od najduljih genoma među ljudskim virusima. Genom dvolančane DNA divljeg tipa HCMV-a ima veličinu od oko 235 kb i kodira oko 208 proteina (Söderberg-Nauclér, 2006.). Ima karakterističnu arhitekturu genoma klase E-herpesvirusa, koja se sastoji od duge regije UL i kratke regije US (Mlera i sur., 2020.). Prevalencija ovog virusa iznosi od 55% do 100%, ovisno o različitim socioekonomskim i geografskim faktorima. Antitijela specifična za HCMV mogu se naći u cirkulirajućoj krvi 83% populacije (Zuhair i sur., 2019.). Seroprevalencija HCMV-a za Republiku Hrvatsku iznosi 74,4% (Vilibic-Cavlek i sur., 2017.). Međutim,

kod CD34+ hematopoetskih progenitorskih stanica koje nisu inficirane HCMV-om, seronegativnost nije uvijek utvrđena (Khaiboullina i sur., 2004.). Kriteriji za uključivanje u istraživanje prof. Vilibić-Čavlek značajno su različiti od kriterija za odabir darivatelja matičnih stanica, stoga podudarnost rezultata nije moguće očekivati.

Regija ULb' genoma HCMV-a kodira 4 gena *UL133*, *UL135*, *UL136* i *UL138* (*UL133/8*) koji su odgovorni za prilagodbu virusa u stanici domaćina (Mlera i sur., 2020.). Proteini UL133 i UL138 su u međusobnoj interakciji kako bi omogućili latenciju odnosno reaktivaciju HCMV-a u stanici (Goodrum, 2016.).

Jedan od načina ulaska HCMV-a u stanicu domaćina je preko receptora EGF-a. Proteini UL135 i UL138 mogu regulirati virusni ciklus djelujući na receptore tirozinske kinaze kroz signalne putove MEK/ERK (Hancock i sur., 2020.; Bughio i sur., 2015.; Buehler i sur., 2019.). Protein UL138 pojačava signalizaciju kroz EGFR uzrokujući njegovu prekomjernu ekspresiju, a time i povećanu količinu na površini stanice te uzrokuje supresiju virusne replikacije (Slika 5). Protein UL135 utišava signalizaciju EGFR-om i smanjuje ekspresiju PI3K te na taj način omogućuje reaktivaciju i replikaciju virusa (Slika 5).



Slika 5. Regulacija ciklusa citomegalovirusa preko EGFR-a. Preuzeto i prilagođeno prema Hancock i sur., 2020.

U tumorskoj stanici HCMV osigurava odgovarajući okoliš ometanjem unutarstaničnih signalnih putova. Neposredno rani proteini IE1 i IE2, te najveći tegumentni protein UL36 i unutarnji tegumentni protein UL37 HCMV-a ulaze u interakciju s proteinom p53 i faktorom tumorske nekroze (TNF, od eng. *tumor necrosis factor*) koji su odgovorni za regulaciju staničnog ciklusa, popravak DNA i apoptozu te povećavaju uspješnost preživljavanja inficirane tumorske stanice i utječu na jačanje potencijala karcinogenosti (Falcão i sur., 2017.). Neposredno rani geni *MIE* HCMV-a (*MIE*, od eng. *major immediate early*), neophodni su za pokretanje ciklusa replikacije virusa (Stinski i Isomura, 2008.). Produkti gena *MIE* rijetko se eksprimiraju tijekom latencije HCMV-a. Promotor koji potiče aktivaciju gena *MIE* uključuje se ili isključuje ovisno o imunosnoj obrani domaćina. Virus HCMV preko gena *MIE* inhibira protein p53, te na taj način djeluje kao onkogen (Falcão i sur., 2017.; Mui i sur., 2017.). Gen *UL55* koji kodira glikoprotein B (*gB*) HCMV-a ima ključnu ulogu u vezanju virusa za stanicu i kasnije u replikacijskom ciklusu virusa. Također je meta za humoralni i stanični imunosni odgovor domaćina (Coaquette i sur., 2004.).

## 2.2. Imunosni sustav

Imunosni sustav čini mreža stanica i organa (slezena, limfni čvorovi, ostala limfatička tkiva, stanice koštane srži i leukociti) koji sudjeluju u prepoznavanju i eliminaciji virusa, bakterija i tumora, u organizmu domaćina (Abbas i sur., 2018.). Limfociti T i B su visokospecijalizirane stanice koje imaju ključnu ulogu u specifičnoj (stečenoj) staničnoj imunosti. Limfociti T imaju brojne funkcije koje omogućuju obranu od patogenih mikroorganizama i tumora (Bisset i sur., 2004.). Sazrijevanjem limfocita dolazi do promjena u ekspresiji markera na površini stanice. Najvažniji površinski markeri su T-signalna molekula CD3 i koreceptorske molekule CD4 i CD8 (Batinić, 2005.). S obzirom na različite površinske markere dobivene procesom sazrijevanja, razlikuju se pomoćnički, citotoksični i regulacijski limfociti T. Na ljudskim pomoćničkim limfocitima T eksprimiran je diferencijacijski marker CD4. Pomoćnički limfociti T prepoznaju patogeni antigen, tj. peptid vezan za molekulu MHC-II na membrani stanica koje prezentiraju antigen. Citotoksični limfociti T imaju eksprimiran diferencijacijski marker CD8



(Marušić-Galesić i sur., 1988.; Batinić, 2005.). Oni uništavaju stanice tumora i vlastite stanice zaražene virusom. Aktivirani citotoksični limfociti T luče brojne citokine poput interferona gama (IFN- $\gamma$ ) i faktora tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ) (Abbas i sur., 2018.; Batinić, 2005.). Pomoćnički i citotoksični limfociti T imaju sinergijski učinak kod prisutnosti unutarstaničnih antigena poput onih tumora i virusa. Za imunizaciju citotoksičnih limfocita T potrebna je aktivacija pomoćničkih limfocita T. Pomoćnički limfociti T luče citokin interleukin-2 (IL-2) koji je važan za proliferaciju citotoksičnih limfocita T. Limfociti T usko surađuju s limfocitima B. Glavna funkcija limfocita B je da nakon prijelaza u plazma-stanice stvaraju antitijela (imunoglobuline) ili postaju memorijske stanice. Limfociti B eksprimiraju klasu molekula MHC-II i razne druge molekule CD specifične za B-stanice. Odgovorni su za brzi imunski odgovor prilikom ponovnog izlaganja virusu. Limfociti B, pomoćnički limfociti T, citotoksični limfociti T, i njihove podskupine važni su za procjenu imunskog odgovora (Abbas i sur., 2018.). Stanice NK sudjeluju u procesima imunosti obrane staničnog tipa tako što uništavaju patogeni mikroorganizam ili tumor. Stanice NK eksprimiraju molekule CD2, CD8, CD16 i CD56, dok ekspresija CD3 i CD4 za njih nije karakteristična. Pripadaju kategoriji urođenih limfatičkih stanica. Induciraju apoptozu u zaraženim ili promijenjenim stanicama pomoću brojnih putova (Khan i sur., 2021.). Aktivirane stanice NK izravno ubijaju ciljane tumorske stanice ili stanice zaražene virusom kroz mehanizam otpuštanja citoplazmatskih granula, apoptozom, proizvodnjom efektorskih molekula ili staničnom citotoksičnošću potaknutom prisutnim antitijelima. Stanice NK mogu lučiti nekoliko citokina poput IFN- $\gamma$ , interleukina 1 (IL-1) i TNF- $\alpha$ . Izlučivanjem IFN- $\gamma$ , stanice NK mogu utjecati na stečeni imunski sustav promicanjem diferencijacije pomoćničkih stanica tipa 1 (Th1, od eng. *T helper 1 cell*) i inhibiranjem stanica tipa 2 (Th2, od eng. *T helper 2 cell*). Maligni tumori i neki virusi poput HCMV-a mogu izbjeći eliminaciju imunskim odgovorom, stvaranjem proteina koji utječu na imunski proces (Groth i sur., 2010.). Aktivacija stanica NK rezultira lučenjem interleukina (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10), IFN- $\gamma$  i citokina. Interferon IFN- $\gamma$  aktivira T-stanice i makrofage koji su važni u imunitetu posredovanom stanicama, dok interleukin IL-4 djeluje na B-stanice i pridonosi humoralnom imunitetu (Khan i sur., 2021.).

### **2.2.1. Citokini**

Citokini su proteini male molekulske mase, od 6-70 kDa. Djeluju kao posrednici u međustaničnoj komunikaciji imunskog sustava. Imaju važnu ulogu u procesu rasta, diferencijacije i sazrijevanja stanica imunskog sustava (Abbas i sur., 2018.; Dinarello, 2007.). Kada se citokin veže na odgovarajući receptor (citokinski receptor), dolazi do aktivacije ili inhibicije signalnog puta koji određeni citokin potiče (Hughes i Nibbs, 2018.). Citokini se najčešće dijele na interleukine (IL), interferone (IFN), citoksine i faktore rasta hematopoetskih kolonija. Interleukini su skupina citokina koji posreduju u komunikaciji između različitih vrsta limfatičkih stanica. Citoksini mogu ubiti ciljane stanice, a faktori stimulacije kolonija potiču rast i diferencijaciju hematopoetskih stanica. Struktura citokina je međusobno slična, a svi pripadaju porodici glikoproteina. Poznato je preko 30 različitih citokina i 29 vrsta interleukina, koji se nazivaju od IL-1 do IL-29 (Opal i DePalo, 2000.). Prema funkcijama i ostalim svojstvima, citokini se dijele na medijatore i regulatore nespecifične (prirodne) imunosti, medijatore i regulatore specifične (stečene) imunosti i stimulare hematopoeze (Abbas i sur., 2018.).

### **2.2.2. Kemokini i kemokinski receptori**

Kemokini su velika porodica malih proteina molekulske mase od 8 do 14 kDa. Podijeljeni su u četiri klase (C, C-C, C-X-C i C-X3-C) na temelju lokacije ključnih cisteinskih ostataka koji sudjeluju u disulfidnoj vezi (Abbas i sur., 2018.; Miller i Mayo, 2017.). Kemokini imaju središnju ulogu u razvoju i homeostazi imunskog sustava te su uključeni u sve zaštitne ili destruktivne imunodne i upalne reakcije, a inducirani su primarnim proupalnim medijatorima kao što su IL-1 ili TNF. Najpoznatiji su po sposobnosti da stimuliraju migraciju stanica, ponajviše leukocita, potičući putove prijenosa signala unutar stanice kao dio imunskog odgovora na patogeni mikroorganizam (Hughes i Nibbs, 2018.). Staničnu signalizaciju reguliraju preko sedam transmembranskih receptora spojenih na površinski stanični protein G (Zhang i sur., 2015.). Jedini predstavnik grupe C-X3-C je fraktalkin s kemotaktičnim i adhezijskim djelovanjem na limfocite T i stanice NK. Kemokini C-X-C djeluju kemotaktino na neutrofilne leukocite. Prvi otkriveni kemokin je CXCL8, a sintetizira se u makrofagima i

endotelnim stanicama. Kemokin CXCL13 selektivno je toksičan za limfocite B i sudjeluje u kontroli organizacije limfocita B u limfnim organima. Djeluje preko receptora CXCR5 eksprimiranog na zrelih limfocitima B. Kemokini C privlače limfocite T i stanice NK. Kemokini C-C privlače makrofage, limfocite i stanice NK.

Kemokini su prisutni i u tumorskom mikrokolišu gdje je njihova uloga usmjeravanje leukocita na mjesto tumora (Burger i Kipps, 2006.). Mogu imati dvostruku ulogu u progresiji odnosno, mogu spriječiti ili potaknuti rast i razvoj tumora (Medzhitov i Janeway, 2000.). Kemokini CXCL1 i CXCL8 povećavaju invazivnost stanica melanoma (Dhawan i Richmond, 2002.). Brojni kemokini poput CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL2, CXCL7, CXCL8 i CXCL10 promotori su metastatskog potencijala karcinoma dojke (Liu i sur., 2020.). Kemokin CCL2 je najčešće eksprimiran kemokin kod karcinoma jajnika (Zhang i sur., 2022.). Prisutnost kemokina CCR7 kod karcinoma pluća nemalih stanica povezana je s razvojem metastaza u limfnim čvorovima (Takanami, 2003.). Kemokin CXCR4 najčešće je eksprimiran kemokin čije se promjene u ekspresiji povezuju s različitim vrstama tumora uključujući i karcinom pluća nemalih stanica (Wald, 2018.; Stumpf i sur., 2018.; Burger i Kipps, 2006.)

### **2.2.3. Tumorsko izbjegavanje imunskog odgovora**

Tumorske stanice mogu izbjeći prepoznavanje od stanica NK na nekoliko načina. Jedan od načina je utišavanje ekspresije gena *MICA/B* (*MICA* od engl. *MHC class I chain-related gene A/B*). Promjene u enzimima koje modificiraju DNA kao što su histonska deacetilaza (HDAC) ili onih koje reguliraju mikroRNA, utišavaju ekspresiju gena *MICA/B*, ekspresiju aktivirajućih liganda i kontinuirano aktiviranje receptora NKG2D na površini stanica NK što dovodi do hiporeaktivnosti i smanjene citotoksičnosti (zbog smanjene ekspresije NKG2D i smanjene proizvodnje IFN- $\gamma$ ). Citokini kao što su TGF (TGF, od eng. *transforming growth factor*) i IFN- $\gamma$ , koje luče tumorske stanice, suzbijaju ekspresiju gena *MICA/B*, smanjuju ekspresiju NKG2D i proizvodnju IFN- $\gamma$  u stanicama NK te potiču pretvorbu pomoćničkih limfocita T u regulacijske limfocite T koji eksprimiraju CD4, CD25, i FOXP3 (FOXP3, od eng. *forkhead box protein 3*). Regulacijski limfociti T suzbijaju imunski odgovor i utječu na regulaciju proteina MMP (MMP, od eng. *metalloproteinases*) i ADAM (ADAM, od eng. *disintegrin and*

*metalloproteinases*), koji dalje potiču odbacivanje aktivirajućih liganda kao što je MICA. Ligand MICA se veže na NKG2D na pomoćničkim limfocitima T i na stanicama NK, što dovodi do hiporeaktivnosti stanica NK zbog degradacije NKG2D i pretvorbe pomoćničkih u regulacijske limfocite T (Groth i sur., 2011.).

#### **2.2.4. Virusno izbjegavanje imunskog odgovora**

Virusi mogu biti različitog stupnja patogenosti od vrlo niskog do vrlo visokog te vješto izbjegavati odgovor imunskog sustava domaćina. Sposobnost virusa da različitim mehanizmima obrane i demaskiranja izbjegnu eliminaciju imunskim odgovorom, omogućuje daljnju interakciju sa stanicama domaćina. Nakon infekcije postoje dva moguća ishoda virusne interakcije sa stanicama domaćina. Jedan od ishoda je infekcija tijekom koje se virus razmnožava i oslobađa iz inficirane stanice, pri čemu stanica umire. Drugi ishod je trajna infekcija stanice. Među virusima koji mogu uzrokovati trajne infekcije su herpesvirusi poput HCMV-a (Hancock i sur., 2020.). Kako bi zaobišao eliminaciju od strane stanica NK, HCMV koristi proteine UL18, UL142 i UL40. Protein UL18 oponaša molekule klase MHC I i služi kao ligand-mamac za inhibicijske receptore stanica NK. Protein UL40 služi za prezentaciju na molekulama HLA-E. Kompleksi HLA-E vežu se na inhibicijski NK-stanični receptor CD94/NKG2A i na taj način sprečavaju aktivaciju stanica NK. Pojedini sojevi HCMV-a povećavaju otpornost zaraženih stanica domaćina na ubijanje od strane stanica NK utišavanjem ekspresije gena za LFA-3 (LFA-3, od eng. *lymphocyte function-associated antigen 3*), što onemogućava vezanje LFA-3 na receptor CD2 koji aktivira stanice NK. Genski produkt miR1, E3-ubikvitinligaza, inhibira citotoksičnost stanica NK utišavanjem gena za ligand ICAM-1 (ICAM-1, od eng. *intercellular adhesion molecule 1*), ubikvitilacijom B7-2 i smanjenom površinskom ekspresijom receptora stanica NK. Protein UL16 kojeg kodira HCMV veže se na proteine ULBP (ULBP, od eng. *UL-binding protein*) i MICB (MICB, od eng. *MHC class I polypeptide-related sequence B*) u stanicama zaraženim virusom što dovodi do inhibicije njihove interakcije s aktivirajućim receptorom NKG2D (Buehler i sur., 2019.).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

U ovo istraživanje uključena su 102 bolesnika s novootkrivenim adenokarcinomom pluća dijagnosticiranim u Klinici za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb. U istraživanje su uključeni bolesnici oba spola, koji su stariji od 18 godina, i koji do pristupanja istraživanju nisu primili niti jedan oblik terapije za liječenje karcinoma pluća. Svi bolesnici obuhvaćeni istraživanjem dali su informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Skupinu bolesnika s dijagnozom adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* (N=51) sačinjavalo je 19 ispitanika muškog spola i 32 ispitanice ženskog spola. U trenutku postavljanja dijagnoze, prosječna dob ispitanika bila je 67,9 godina (raspon 39 - 88). Među ispitanicima, ukupan broj nepušača iznosio je 27, a pušača (uključujući i bivše pušače) 18. Pušački status bio je nepoznat za šest ispitanika (Tablica 1).

Tablica 1. Ispitanici s adenokarcinomom pluća s mutacijama u genu *EGFR*

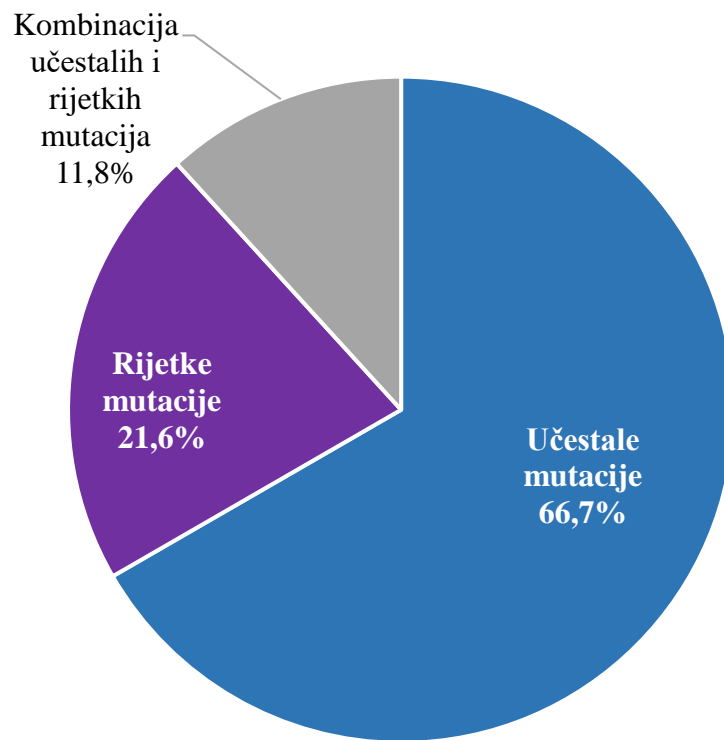
<b>Spol</b>	<b>Nepušači</b>	<b>Pušači</b>	<b>Nepoznat pušački status</b>	<b>Prosječna dob u trenutku postavljanja dijagnoze (godine)</b>
<b>Muškarci (N=19)</b>	10	7	2	68,6 (raspon 39 – 86)
<b>Žene (N=32)</b>	17	11	4	67,6 (raspon 47 – 88)

Skupinu s dijagnozom adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* (N=51) sačinjavala su 42 ispitanika muškog spola i devet ispitanica ženskog spola. U trenutku postavljanja dijagnoze, prosječna dob ispitanika bila je 66,5 godina (raspon 53 - 85). Među ispitanicima bilo je 48 pušača (uključujući i bivše pušače) i jedan nepušač. Pušački status bio je nepoznat za dva ispitanika muškog spola (Tablica 2).

Tablica 2. Ispitanici s adenokarcinomom pluća bez mutacija u genu *EGFR*

<b>Spol</b>	<b>Nepušači</b>	<b>Pušači</b>	<b>Nepoznat pušački status</b>	<b>Prosječna dob u trenutku postavljanja dijagnoze (godine)</b>
<b>Muškarci (N=42)</b>	0	40	2	66,8 (raspon 56 – 85)
<b>Žene (N=9)</b>	1	8	0	65,9 (raspon 53 – 81)

U istraživanoj skupini s adenokarcinomom pluća s mutacijama u genu *EGFR*, učestale mutacije u genu *EGFR* (ex19del, L858R) imala su 34 (66,7%) ispitanika, a rijetke mutacije u genu *EGFR* (G719X, ex20ins, S768I, T790M i ex21) 11 (21,6%) ispitanika. Šest ispitanika (11,8%) s dijagnozom adenokarcinoma pluća imalo je kombinaciju učestalih i rijetkih mutacija gena *EGFR* (Slika 6).



Slika 6. Raspodjela zastupljenosti vrsta mutacija gena *EGFR* kod ispitanika s adenokarcinomom pluća.

### 3.2. Uzorci

U istraživanju su korišteni bronhoskopski uzorci koji su rutinski obrađeni i analizirani u Odjelu za pulmološku citologiju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb (Roh, 2019.; Harabajsa i sur., 2021.; Lozano i sur., 2018.) i periferna krv ispitanika uzorkovana prije primjene terapije za karcinom pluća. Dijagnoza adenokarcinoma pluća postavljena je na citološkim razmazima prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2021.). Nakon utvrđivanja statusa EGFR, odabran je uzorak s optimalnim brojem tumorskih stanica i uzorkovana je periferna krv svakog ispitanika uključenog u istraživanje. Citološka stakla sa stanicama adenokarcinoma pluća, obojana metodom May-Grünwald Giemsa po Pappenheimu (MGG), pohranjena su na sobnoj temperaturi do provođenja daljnjih analiza (Harabajsa i sur., 2021.; Schmitt i sur., 2022.).

Periferna krv za potrebe protočne citometrije uzorkovana je venepunkcijom u epruvetu koja sadrži antikoagulans K<sub>3</sub>EDTA. Svaka je epruveta označena šifriranim podacima koji odgovaraju pojedinom ispitaniku i sadržavala je 5 mL periferne krvi. Periferna krv je najkasnije dva sata nakon uzimanja analizirana protočnom citometrijom.

Periferna krv ispitanika s adenokarcinomom pluća namijenjena detekciji HCMV-a uzorkovana je venepunkcijom u set od tri epruvete (QuantiFERON CMV, Qiagen, Njemačka) koji čine pozitivna mitogenska kontrola, antigen citomegalovirusa i nulta kontrola. Svaka je epruveta označena šifriranim podacima koji odgovaraju pojedinom ispitaniku i sadržavala je 1 mL krvi. Nakon uzorkovanja krvi, epruvete su lagano protrešene deset puta kako bi se krv jednolično rasporedila po stijenkama i omogućila otapanje antigena. Epruvete su zatim inkubirane u uspravnom položaju na 37 °C tijekom 24 sata (Mini Galaxy E CO<sub>2</sub> Incubator, RS Biotech, New Brunswick, Kanada). Nakon centrifugiranja na 2500 g kroz 10 minuta (EBA 21, Hettich<sup>®</sup>, Njemačka) izdvojena je plazma za utvrđivanje količine IFN- $\gamma$  (IU/ml) metodom ELISA QF-CMV. Uzorci plazme pohranjeni su na -80 °C do detekcije prisutnosti HCMV-a.



### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Izolacija DNA i RNA

Istovremena izolacija DNA i RNA učinjena je setom kemikalija Quick-DNA/RNA<sup>TM</sup> FFPE Kit (Zymo Research, SAD) prema uputama proizvođača, bez postupka deparafinizacije. Citološka stakla s uzorcima adenokarcinoma pluća tretirana su puferom za lizu DNA/RNA kako bi se stanice odvojile od stakla. Lizirane stanice su prebačene u kolone unutar sabirnih epruveta (Zymo-Spin<sup>TM</sup> IICR Column, Zymo Research, SAD) nakon čega je izolacija napravljena prema uputi proizvođača. Nakon završenog postupka izolacije DNA i RNA, količina od 2  $\mu$ L uzorka u vodi bez nukleaza, korištena je za određivanje koncentracije i apsorbancije nukleinskih kiselina (A260/280 i A260/230) pomoću UV-spektrofotometra (NanoVue Plus spectrophotometer, Healthcare Bio-Sciences AB, Švedska). Uzorci DNA i RNA pohranjeni su na -20 °C do trenutka provođenja analiza.

#### 3.3.2. Analiza razine ekspresije gena koji sudjeluju u imunosnom odgovoru

Promjene u ekspresiji specifičnih gena koji sudjeluju u imunosnom odgovoru kod adenokarcinoma pluća analizirane su metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (Q-RT PCR, od eng. *real-time quantitative reverse transcription PCR*) kod šest nasumično odabranih uzoraka (tri s mutacijom u genu *EGFR* i tri bez mutacije u genu *EGFR*). Za određivanje ekspresije korištene su pločice RT2 Profiler PCR Array Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk (Qiagen, Njemačka) koje sadrže parove početnica za 84 gena od interesa uključena u komunikaciju između tumora, tumorskog mikrookoliša i imunosnog sustava (Tablica 3), i početnice za pet endogenih kontrola. Nakon provedene analize razine ekspresije gena kod šest uzoraka adenokarcinoma pluća i utvrđenih značajnih razlika u analiziranim genima, za daljnju analizu odabrani su geni *IL-1 $\beta$*  i *CXCR4*.

Tablica 3. Popis analiziranih gena

<b>Simbol gena</b>	<b>Opis</b>
<i>ACKR3</i>	Gen za kemokinski (C-X-C) receptor 7
<i>AICDA</i>	Gen za citidinsku deaminazu potaknutu aktivacijom
<i>BCL2</i>	Gen za protein B stanični limfom 2
<i>BCL2L1</i>	Gen za protein 1 sličan proteinu B staničnog limfoma 2
<i>CCL18</i>	Gen za kemokinski (C-C) ligand 18
<i>CCL2</i>	Gen za kemokinski (C-C) ligand 2
<i>CCL20</i>	Gen za kemokinski (C-C) ligand 20
<i>CCL21</i>	Gen za kemokinski (C-C) ligand 21
<i>CCL22</i>	Gen za kemokinski (C-C) ligand 22
<i>CCL28</i>	Gen za kemokinski (C-C) ligand 28
<i>CCL4</i>	Gen za kemokinski (C-C) ligand 4
<i>CCL5</i>	Gen za kemokinski (C-C) ligand 5
<i>CCR1</i>	Gen za kemokinski (C-C) receptor 1
<i>CCR10</i>	Gen za kemokinski (C-C) receptor 10
<i>CCR2</i>	Gen za kemokinski (C-C) receptor 2
<i>CCR4</i>	Gen za kemokinski (C-C) receptor 4
<i>CCR7</i>	Gen za kemokinski (C-C) receptor 7
<i>CCR9</i>	Gen za kemokinski (C-C) receptor 9
<i>CD274</i>	Gen za protein CD274
<i>CSF1</i>	Gen za faktor rasta kolonija 1
<i>CSF2</i>	Gen za faktor rasta kolonija 2

Tablica 3-nastavak. Popis analiziranih gena

<b>Simbol gena</b>	<b>Opis</b>
<b><i>CSF3</i></b>	Gen za faktor rasta kolonija 3
<b><i>CTLA4</i></b>	Gen za citotoksični protein 4 povezan s limfocitima T
<b><i>CXCL1</i></b>	Gen za kemokinski (C-X-C) ligand 1
<b><i>CXCL10</i></b>	Gen za kemokinski (C-X-C) ligand 10
<b><i>CXCL11</i></b>	Gen za kemokinski (C-X-C) ligand 11
<b><i>CXCL12</i></b>	Gen za kemokinski (C-X-C) ligand 12
<b><i>CXCL2</i></b>	Gen za kemokinski (C-X-C) ligand 2
<b><i>CXCL5</i></b>	Gen za kemokinski (C-X-C) ligand 5
<b><i>CXCL9</i></b>	Gen za kemokinski (C-X-C) ligand 9
<b><i>CXCR1</i></b>	Gen za kemokinski (C-X-C) receptor 1
<b><i>CXCR2</i></b>	Gen za kemokinski (C-X-C) receptor 2
<b><i>CXCR3</i></b>	Gen za kemokinski (C-X-C) receptor 3
<b><i>CXCR4</i></b>	Gen za kemokinski (C-X-C) receptor 4
<b><i>CXCR5</i></b>	Gen za kemokinski (C-X-C) receptor 5
<b><i>EGF</i></b>	Gen za epidermni faktor rasta
<b><i>EGFR</i></b>	Gen za receptor epidermnog faktora rasta
<b><i>FASLG</i></b>	Gen za ligand Fas
<b><i>FOXP3</i></b>	Gen za FOXP3, od eng. <i>forkhead box P3</i>
<b><i>GBP1</i></b>	Gen za protien koji veže gvanilat 1
<b><i>GZMA</i></b>	Gen za granzyme A
<b><i>GZMB</i></b>	Gen za granzyme B

Tablica 3-nastavak. Popis analiziranih gena

<b>Simbol gena</b>	<b>Opis</b>
<i>HIF1<math>\alpha</math></i>	Gen za inducibilni faktor hipoksije 1
<i>HLA-A</i>	Gen za ljudski leukocitni antigen, klasa 1, A
<i>HLA-B</i>	Gen za ljudski leukocitni antigen, klasa 1, B
<i>HLA-C</i>	Gen za ljudski leukocitni antigen, klasa 1, C
<i>IDO1</i>	Gen za indoleaminsku 2,3-dioksigenu 1
<i>IFNG</i>	Gen za interferon gama
<i>IGF1</i>	Gen za inzulinu sličan faktor rasta 1 (somatomedin C)
<i>IL-10</i>	Gen za interleukin 10
<i>IL-12<math>\alpha</math></i>	Gen za interleukin 12 $\alpha$
<i>IL-12<math>\beta</math></i>	Gen za interleukin 12 $\beta$
<i>IL-13</i>	Gen za interleukin 13
<i>IL-15</i>	Gen za interleukin 15
<i>IL-17<math>\alpha</math></i>	Gen za interleukin 17 $\alpha$
<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	Gen za interleukin 1 $\alpha$
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	Gen za interleukin 1 $\beta$
<i>IL-2</i>	Gen za interleukin 2
<i>IL-23<math>\alpha</math></i>	Gen za interleukin 23 $\alpha$
<i>IL-4</i>	Gen za interleukin 4
<i>IL-6</i>	Gen za interleukin 6
<i>IL-8</i>	Gen za interleukin 8
<i>IRF1</i>	Gen za interferonski regulacijski faktor 1

Tablica 3-nastavak. Popis analiziranih gena

<b>Simbol gena</b>	<b>Opis</b>
<b><i>KITLG</i></b>	Gen za ligand KIT
<b><i>MICA</i></b>	Gen za sekvencu A povezanu s polipeptidom klase MHC I
<b><i>MICB</i></b>	Gen za sekvencu B povezanu s polipeptidom klase MHC I
<b><i>MIF</i></b>	Gen za inhibicijski faktor migracije makrofaga
<b><i>MYC</i></b>	Gen za homolog virusnog onkogeno V-myc mijelocitomatoze
<b><i>MYD88</i></b>	Gen primarnog odgovora mijeloične diferencijacije
<b><i>NFKB1</i></b>	Gen za NFKB1, od eng. <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
<b><i>NOS2</i></b>	Gen za inducibilnu sintazu dušikovog oksida 2
<b><i>PDCD1</i></b>	Gen za proteine programirane stanične smrti 1
<b><i>PTGS2</i></b>	Gen za prostaglandinsko-endoperoksidnu sintazu 2
<b><i>SPP1</i></b>	Gen za za izlučeni fosfoprotein 1
<b><i>STAT1</i></b>	Gen za provoditelj signala i aktivator transkripcije 1
<b><i>STAT3</i></b>	Gen za provoditelj signala i aktivator transkripcije 3
<b><i>TGFB1</i></b>	Gen za transformirajući faktor rasta beta 1
<b><i>TLR2</i></b>	Gen za receptor 2 sličan Toll-u
<b><i>TLR3</i></b>	Gen za receptor 3 sličan Toll-u
<b><i>TLR4</i></b>	Gen za receptor 4 sličan Toll-u
<b><i>TNF</i></b>	Gen za faktor tumorske nekroze
<b><i>TNFSF10</i></b>	Gen za faktor tumorske nekroze 10
<b><i>TP53</i></b>	Gen za tumorski protein p53
<b><i>VEGFA</i></b>	Gen za vaskularni endotelni faktor rasta A

### 3.3.2.1. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija učinjena je kod šest početnih uzoraka RNA setom kemikalija RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača. Pufer (Buffer GE2) je sadržavao sve potrebno za uklanjanje preostale genomske DNA. Dodan je u uzorak koji je sadržavao do 5 µg RNA, zatim je inkubiran na 37 °C tijekom pet minuta. Nakon inkubacije, reakcijska smjesa je stavljena na led na najmanje jednu minutu. Reakcijska smjesa za reverznu transkriptazu BC5 sadržavala je sve komponente potrebne za reverznu transkripciju (nasumične heksamere i oligo-dT početnice, reverznu transkriptazu MMLV, magnezij). Dodana je u pripremljeni uzorak u kojem je uklonjena genomska DNA. Uvjeti reakcije bili su inkubacija na 42 °C tijekom 15 minuta i zaustavljanje reakcije na 95 °C tijekom pet minuta. Dobivene cDNA čuvane su na -20 °C do analize ekspresije gena.

Izolirana RNA svih ostalih uzoraka adenokarcinoma pluća reverznom je transkripcijom prevedena u cDNA pomoću seta kemikalija PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara, Japan) prema uputama proizvođača, uz korištenje nasumičnih heksamera kao početnica (Invitrogen, SAD). Prva reakcijska smjesa (MM1) sadržavala je 5 µM nasumičnih heksamera (Invitrogen, SAD); 1 mM dNTP (Sigma Aldrich, Missouri); do 1 µg RNA te H<sub>2</sub>O očišćenu od RNaza, do maksimalnog volumena od 10 µL. Druga reakcijska smjesa (MM2) sadržavala je 5 U/µL reverzne transkriptaze (Takara, Japan); 1 U/µL inhibitora RNaza (Takara, Japan); 4 µL pufera (1x pufer PSRT (Takara, Japan) te H<sub>2</sub>O očišćenu od RNaza, do ukupnog volumena od 20 µL. U svaku mikroeprevetu s uzorkom koja je sadržavala MM1 dodana je količina od 10 µL MM2. Reverzna transkripcija provedena je prema uvjetima reakcije: 10 minuta na 30 °C, 60 minuta na 42 °C, i 15 minuta na 70 °C. Dobivene cDNA čuvane su na -20 °C do nizvodne analize ekspresije gena.

### 3.3.2.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Smjesa za Q-RT PCR pripremljena je upotrebom seta kemikalija RT qPCR SYBER Green/ROX MasterMix-6 (Qiagen, Njemačka) za svih šest uzoraka, prema uputama proizvođača. Reakcijska smjesa za Q-RT PCR sadržavala je u završnim koncentracijama cDNA do 100 ng po reakciji; 0,05  $\mu$ M svake početnice (Macrogen, Južna Koreja); 1x PowerUp Sybr Green Mastermix (Applied Biosystems, SAD) i H<sub>2</sub>O očišćenu od RNaza, do ukupnog volumena od 20  $\mu$ L. Analiza Q-RT PCR provedena je na uređaju QuantStudio5 (Applied Biosystems, SAD) tijekom 40 ciklusa, prema optimiziranim uvjetima reakcije: aktivacija enzima HotStart DNA *Taq* Polimeraza na 95 °C tijekom 10 minuta; denaturacija na 95 °C tijekom 15 sekundi; prijanjanje i produljivanje lanca na 60 °C tijekom jedne minute. Kako bi se potvrdila specifičnost PCR-a, provedena je analiza krivulje taljenja: 95 °C, jednu minutu; 65 °C, dvije minute (uz isključenu optiku); 65 °C do 95 °C pri 2 °C/minuta (uz uključenu optiku).

Dobivena cDNA svih ostalih uzoraka adenokarcinoma pluća korištena je za određivanje ekspresije gena *IL-1 $\beta$*  i *CXCR4* metodom Q-RT PCR. Reakcija je provedena setom kemikalija PowerUp Sybr Green (Applied Biosystems, SAD) prema uputama proizvođača uz specifične početnice za gene od interesa i endogenu kontrolu *HMBS* (Tablica 4). Reakcijska smjesa za Q-RT PCR sadržavala je u završnim koncentracijama cDNA do 50 ng po reakciji; 0,05  $\mu$ M svake početnice (Macrogen, Južna Koreja); 1x PowerUp Sybr Green Mastermix (Applied Biosystems, SAD) i H<sub>2</sub>O očišćenu od RNaza, do ukupnog volumena od 20  $\mu$ L. Reakcija je provedena tijekom 40 ciklusa u uređaju QuantStudio5 (Applied Biosystems, SAD) prema optimiziranom protokolu: aktivacija enzima uracil-DNA glikozilaze na 50 °C tijekom dvije minute; aktivacija dual-lock DNA polimeraze na 95 °C tijekom 10 minuta; denaturacija na 95 °C tijekom 15 sekundi; prijanjanje i produljivanje lanca na 55 °C tijekom jedne minute. Kako bi se potvrdila specifičnost PCR-a, provedena je analiza krivulje taljenja: 95 °C, 15 sekundi; 55 °C, jednu minutu (uz isključenu optiku); 55 °C do 95 °C pri 2 °C/minuta (uz uključenu optiku).

Tablica 4. Sekvencije početnica za određivanje ekspresije gena *IL-1 $\beta$*  i *CXCR4*

Gen	Ime početnice	Sekvencija početnice (5' - 3')	Veličina (pb)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	IL1BF F	TTCGAGGCACAAGGCACAA	78
	IL1BR R	TGGCTGCTTCAGACACTTGAG	
<i>CXCR4</i>	CXCR4 F	CTCCTCTTTGTCATCACGCTTCC	127
	CXCR4 R	GGATGAGGACACTGCTGTAGAG	
<i>HMBS</i>	HMBS F	AGCTTGCTCGCATAACAGACG	157
	HMBS R	AGCTCCTTGGTAAACAGGCTT	

F-uzvodna početnica, R-nizvodna početnica

### 3.3.2.3. Statistička analiza rezultata

Statistička analiza rezultata dobivenih metodom Q-RT PCR na pločicama RT2 Profiler PCR provedena je T-testom u programu QIAGEN'S Gene Globe Data Analysis Center (<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-translational-research/pcr-qpcr/primer-sets/rt2-profiler-pcr-arrays#resources>).

Rezultati ekspresije dobiveni metodom Q-RT PCR analizirani su neparametrijskim Mann-Whitney testom u programu STATISTICA (verzija 13.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD) kako bi se utvrdila povezanost postojanja mutacija u genu *EGFR* i ekspresije gena *IL-1 $\beta$*  i *CXCR4*. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ .



### 3.3.3. Analiza imunosnog odgovora

Imunosni odgovor ispitanika procijenjen je analizom postotka limfocita T i B, pomoćničkih i citotoksičnih limfocita T, stanica NK, aktiviranih limfocita T koji ekspimiraju HLA-DR, te aktiviranih limfocita T koji ekspimiraju CD38 i CD8 pomoću protočnog citometra BD FACSCanto™ (Becton Dickinson and Company, SAD). Apsolutni broj pomoćničkih limfocita T određen je metodom apsolutne kvantifikacije na protočnom citometru. Za protočnu citometriju, periferna krv svih bolesnika s adenokarcinomom pluća podijeljena je u dvije epruvete, prema uputi proizvođača. U epruvetu koja sadrži paletu liofiliziranih kuglica označenih fluorescentnom bojom (BD Trucount™ tubes, Becton Dickinson and Company, SAD) dodano je 20 µL reagensa u čijem sastavu se nalazi kombinacija monoklonskih antitijela specifičnih za CD3, D16, CD56, CD45, CD4, CD19 i CD8 (BD Multitest™ 6-Color TBNK, Becton Dickinson and Company, SAD), za utvrđivanje apsolutnog broja leukocita i limfocitnih potpopulacija. U polistirensku epruvetu bez liofiliziranih fluorescentnih kuglica (Corning® Falcon, Merck, Njemačka) dodana je ista količina reagensa u čijem sastavu se nalazi kombinacija monoklonskih antitijela specifičnih za CD8, CD38, CD3 i HLA-DR (BD Multitest™ CD8/CD38/CD3/HLA-DR, Becton Dickinson and Company, SAD), za procjenu količine aktiviranih limfocita T. Nakon dodavanja 50 µL pune krvi uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta te je u svaku epruvetu dodana otopina za liziranje eritrocita (BD FACS™ Lysing Solution, Becton Dickinson and Company, SAD) u količini od 450 µL.

#### 3.3.3.1. Statistička analiza rezultata

Rezultati dobiveni metodom protočne citometrije analizirani su neparametrijskim Mann-Whitney testom u programu STATISTICA (verzija 13.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD) kako bi se utvrdila povezanost postojanja mutacija u genu *EGFR* i promjena u imunom odgovoru ispitanika. Za usporedbu postotka limfocitnih potpopulacija korišten je Spearmanov koeficijent korelacije. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ .

### 3.3.4. Analiza infekcije citomegalovirusom

#### 3.3.4.1. Analiza prisutnosti DNA citomegalovirusa

Prisutnost infekcije HCMV-om kod tumorskih stanica određivana je metodom PCR u stanicama adenokarcinoma pluća korištenjem specifičnih setova početnica (Macrogen, Korea). Analizirane su dvije regije: jedna unutar gena *MIE* i druga smještena unutar gena *gB* (Coyle i sur., 2002.; Fenner i sur., 1991.; Alberts i sur., 2002.; Harabajsa i sur., 2023.). Veličina produkta korištena za analizu gena *MIE* bila je 110 pb, a veličina produkta za gen *gB* bila je 326 pb u prvom ciklusu PCR-a s početnicama A i B, a 301 pb u drugom ciklusu s početnicama C i D (Tablica 5). Kao pozitivna kontrola korištena je DNA izolirana iz uzorka periferne krvi bolesnika kod kojeg je potvrđena infekcija HCMV-om.

Tablica 5. Sekvencije početnica za detekciju citomegalovirusa

Početnica	Sekvencija početnice (5' - 3')	Veličina produkta (pb)
<b>MIE F</b>	AGTGTGGATGACCTACGGGCCATCG	110
<b>MIE R</b>	GGTGACACCAGAGAATCAGAGGAGC	
<b>CMV FA</b>	TCATGAGGTCGTCCAGA	326
<b>CMV RB</b>	TGAGGAATGTCAGCTTC	
<b>CMV FC</b>	TCGTCCAGACCCTTGAGGTA	301
<b>CMV RD</b>	CCAGCCTCAAGATCTTCAT	

F-uzvodna početnica, R-nizvodna početnica

#### **3.3.4.1.1. Lančana reakcija polimerazom**

Uzorak za PCR reakciju sadržavao je DNA do 250 µg po reakciji; 5 µL pufera (5x Colourless GoTaq Flexi Buffer, Promega, SAD); 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen, Njemačka); 0,2 mM dNTP (Sigma Aldrich, Njemačka); 0,5 µM svake oligonukleotidne početnice (Macrogen, Korea); 1, 25 U DNA polimeraze (GoTaq DNA polimeraza, Promega, SAD) i dH<sub>2</sub>O do 25 µL. Početnice su kupljene liofilizirane u koncentraciji od 25 nM. Otopljene su tako da se dobije koncentracija od 100 pmol/µL. Sve amplifikacije za HCMV provedene su tijekom 40 ciklusa u uređaju Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cyclor (Applied Biosystems, SAD) prema optimiziranom protokolu: temperatura početne denaturacije od 95 °C tijekom 2 minute; temperatura denaturacije kalupa od 95 °C tijekom 30 sekundi; temperatura vezanja od 60 °C tijekom 30 sekundi i temperatura produljivanja lanca od 72 °C tijekom 40 sekundi. Umnoženi fragmenti su analizirani u 2% agaroznom gelu (40 minuta na 100 V) napravljenom u puferu TAE (Tris-Acetat-EDTA), obojeni etidij-bromidom i vizualizirani pod UV-svjetlom.

#### **3.3.4.1.2. Statistička analiza rezultata**

Rezultati dobiveni metodom PCR analizirani su hi-kvadrat testom u programu STATISTICA (verzija 13.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD) kako bi se utvrdila povezanost postojanja mutacija u genu *EGFR* i prisutnosti infekcije HCMV-om kod tumorskih stanica. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ .

#### **3.3.4.2. Analiza imunskog odgovora specifičnog za citomegalovirus**

Analiza imunskog odgovora na antigene HCMV-a u perifernoj krvi ispitanika učinjena je pomoću metode ELISA (QuantiFERON CMV ELISA, Qiagen, Njemačka) prema uputi proizvođača. Otopina IFN- $\gamma$ , koncentracije 8,0 IU/ml, korištena je za pripremu četiri testna standarda. Mjerenje testnih standarda rađeno je u duplikatu. Otopina konjugata je napravljena otapanjem liofiliziranog konjugata (Reconstituted Lyophilized Conjugate 100x Concentrate, Qiagen, Njemačka) s 0,3 mL vode za injekcije (Aqua pro injectione HZTM, Hrvatski Zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska). Tako

pripremljen konjugat dalje je razrijeđen i korišten za reakciju. Nakon laganog miješanja, količina od 50  $\mu$ L konjugata, plazme i sva četiri standarda dodana je u odgovarajuća udubljena na mikrotitar pločicama (Prilog 1). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi tijekom  $120 \pm 5$  minuta, uzorci su isprani puferom (Wash Buffer 20x Concentrate, Qiagen, Njemačka) i tretirani enzimskim supstratom. Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi, dodano je 50  $\mu$ L enzimske otopine za zaustavljanje reakcije. Unutar pet minuta od dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije, izmjerena je optička gustoća (OD, od eng. *optical density*) korištenjem čitača opremljenog filterom od 450 nm i referentnim filterom od 620 do 650 nm (Captia reader XX800, Trinity biotech).

#### **3.3.4.2.1. Statistička analiza rezultata**

Za izračun rezultata dobivenih metodom ELISA korišten je softver QuantiFERON-CMV preuzet sa stranice [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com).

Rezultati dobiveni metodom ELISA analizirani su hi-kvadrat testom u programu STATISTICA (verzija 13.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD) kako bi se odredila potencijalna povezanost mutacija u genu *EGFR* i imunosnog odgovora specifičnog za antigene citomegalovirusa. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ .

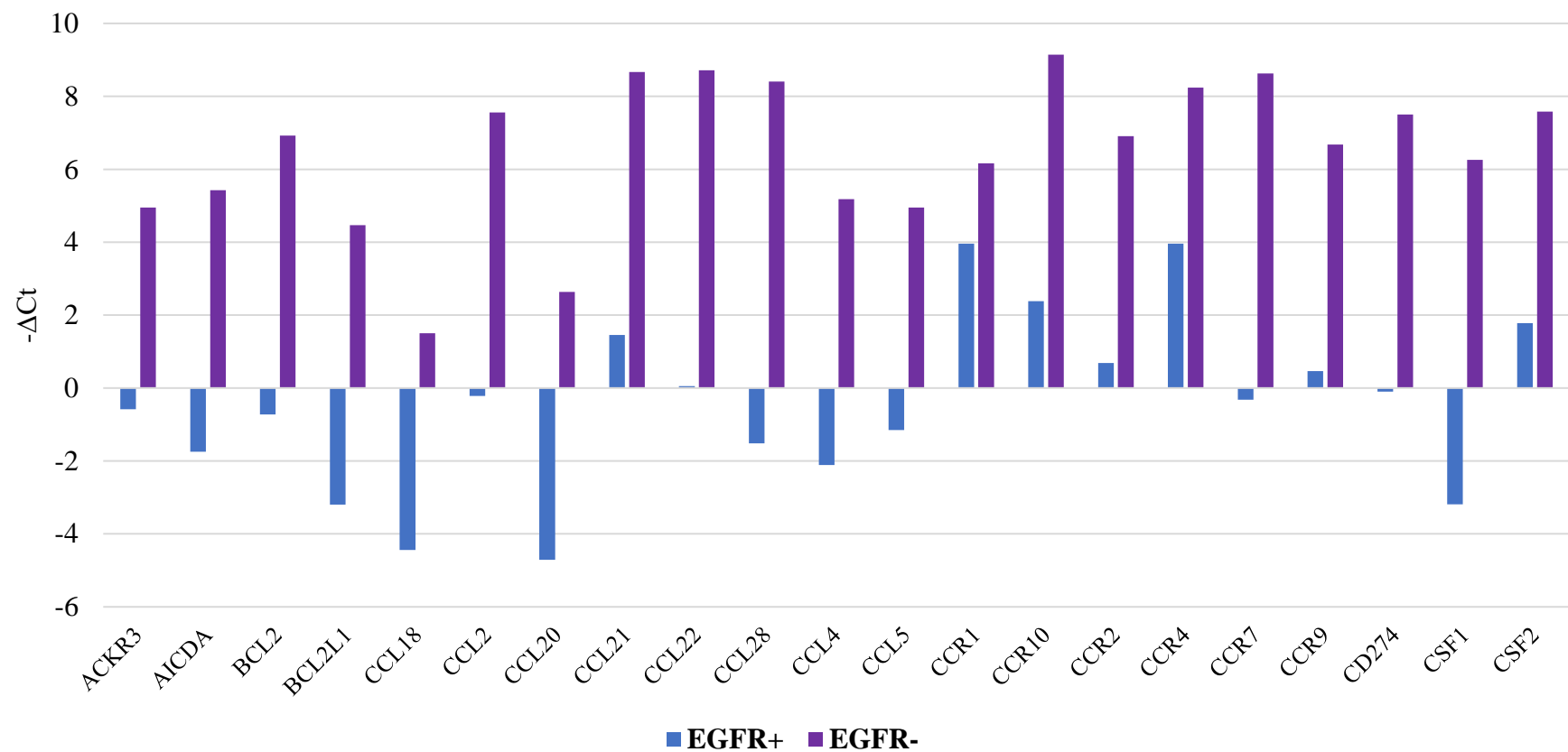
## 4. REZULTATI

### 4.1. Ekspresija gena uključenih u regulaciju imunskog odgovora

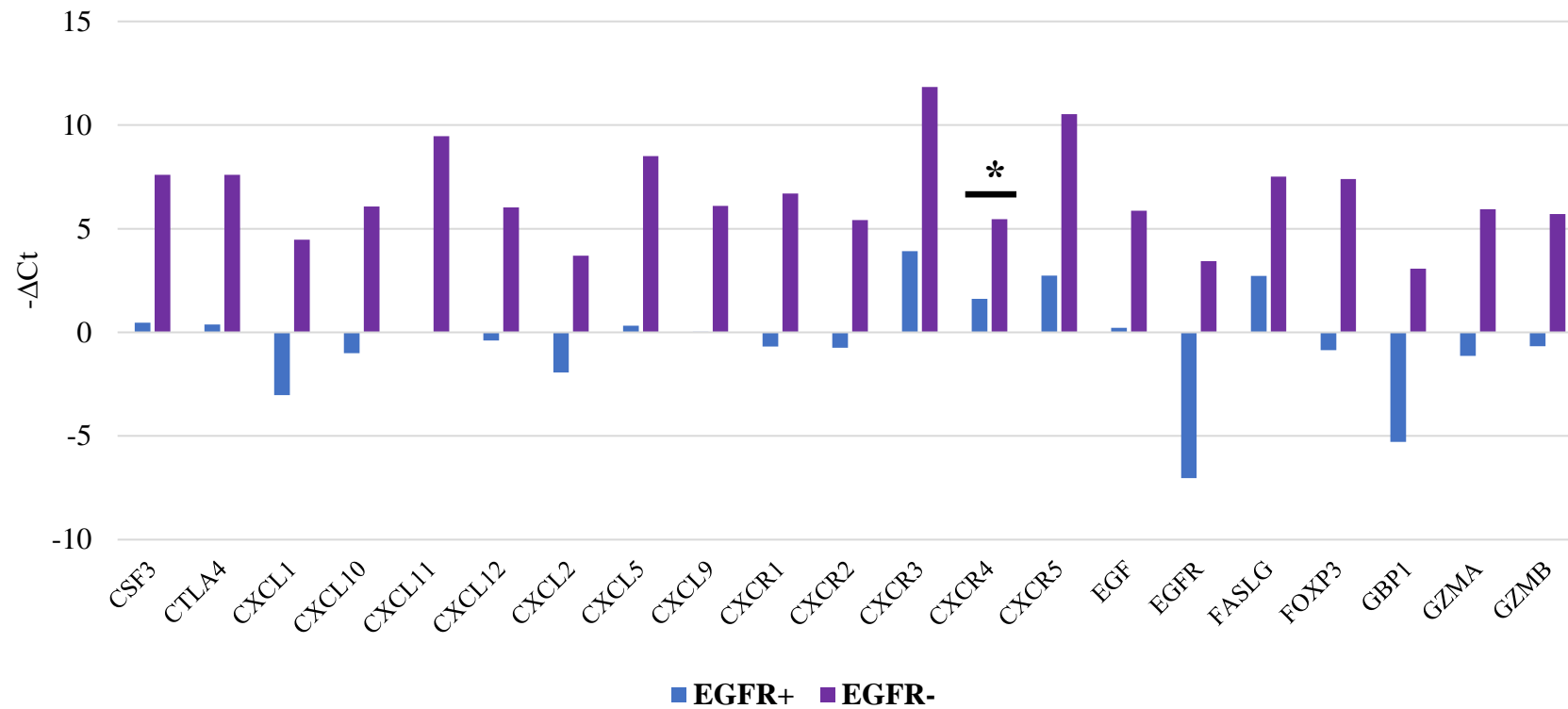
Ekspresija 84 gena koji sudjeluju u regulaciji imunskog odgovora analizirana je u tri uzorka adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* i tri uzorka adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR*. Razine ekspresija analiziranih gena uključenih u regulaciju imunskog odgovora prikazane su Slikom 7.

Statistički značajna razlika utvrđena je samo kod gena *IL-1 $\beta$*  i *CXCR4*. Oba gena su više eksprimirana kod adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR*.

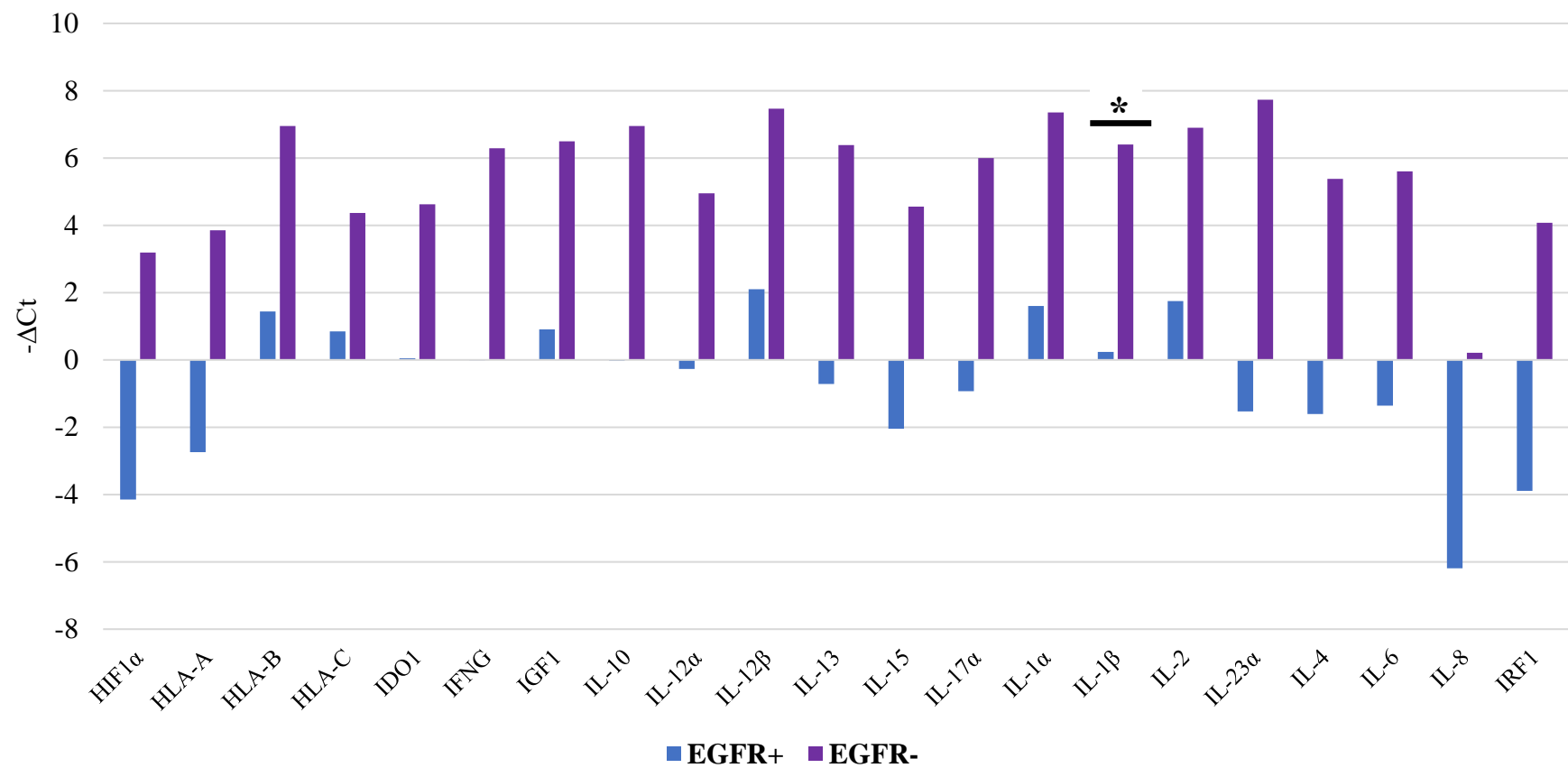
Ekspresija gena *IL-1 $\beta$*  i *CXCR4* analizirana je u 51-om uzorku adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* i u jednakom broju uzoraka adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR*. Rezultati Q-RT PCR analize pokazali su 19 puta višu ekspresiju gena *CXCR4* i devet puta višu ekspresiju gena *IL-1 $\beta$*  u skupini adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* ( $p < 0,05$ ) u odnosu na skupinu adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* (Slika 8). Statistički značajne razlike u ekspresiji gena *IL-1 $\beta$*  i *CXCR4* s obzirom na vrstu mutacije, dob, spol i pušački status ispitanika, nisu utvrđene.



Slika 7. Ekspresija gena uključenih u regulaciju imunskog odgovora kod adenokarcinoma pluća. Kratice: EGFR+, adenokarcinomi pluća s mutacijama u genu *EGFR*; EGFR-, adenokarcinomi pluća bez mutacija u genu *EGFR*.

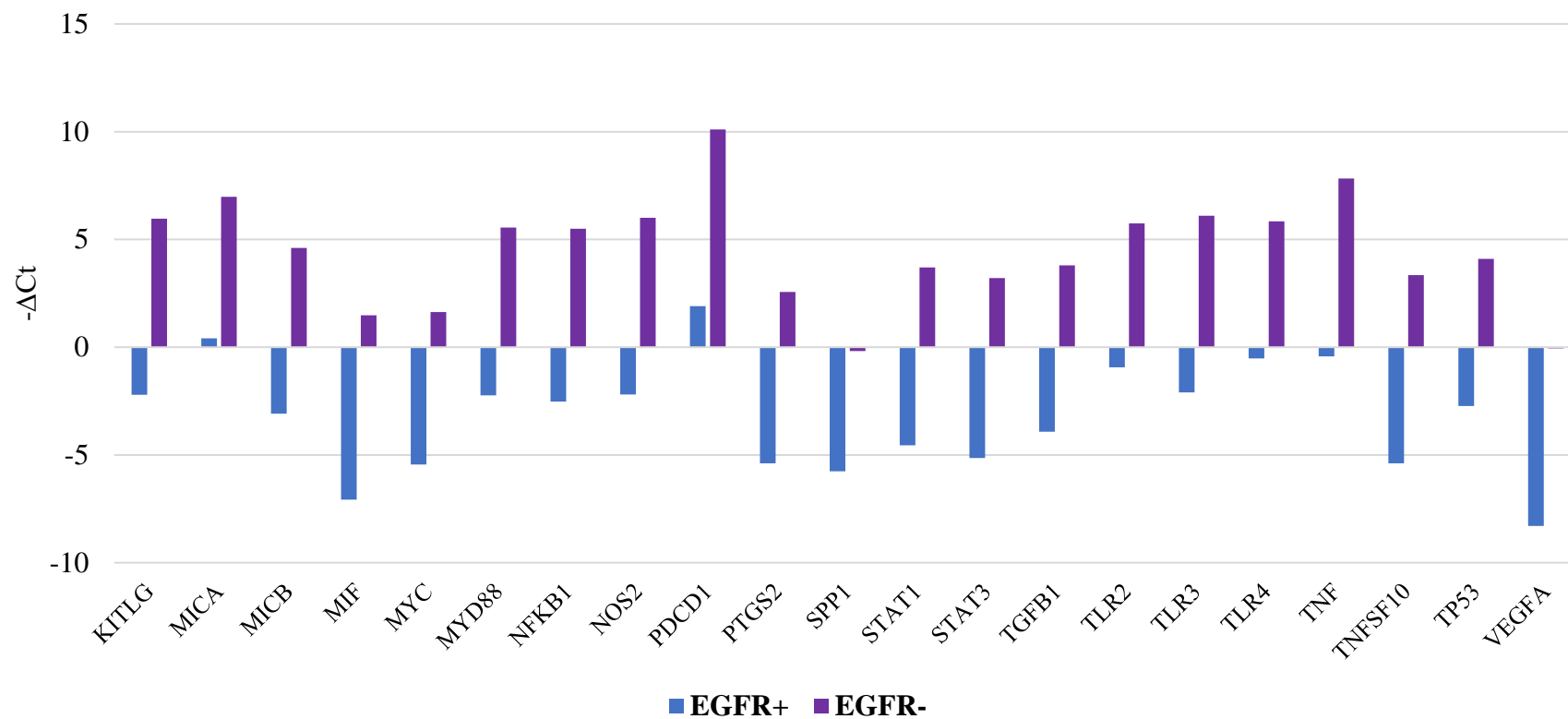


Slika 7-nastavak. Ekspresija gena uključenih u regulaciju imunskog odgovora kod adenokarcinoma pluća. Kratice: EGFR+, adenokarcinomi pluća s mutacijama u genu *EGFR*; EGFR-, adenokarcinomi pluća bez mutacija u genu *EGFR*; \* $p < 0,05$ .

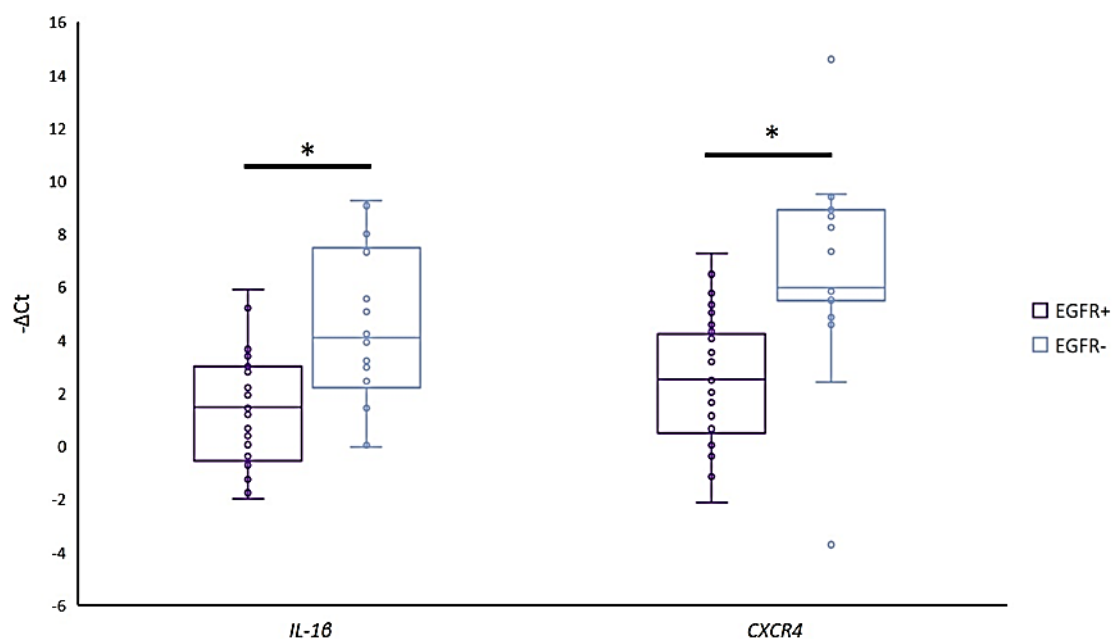


Slika 7-nastavak. Ekspresija gena uključenih u regulaciju imunskog odgovora kod adenokarcinoma pluća. Kratice: EGFR+, adenokarcinomi pluća s mutacijama u genu *EGFR*; EGFR-, adenokarcinomi pluća bez mutacija u genu *EGFR*; \* $p < 0,05$ .





Slika 7-nastavak. Ekspresija gena uključenih u regulaciju imunskog odgovora kod adenokarcinoma pluća. Kratice: EGFR+, adenokarcinomi pluća s mutacijama u genu *EGFR*; EGFR-, adenokarcinomi pluća bez mutacija u genu *EGFR*.



Slika 8. Razlike u razini ekspresije gena *IL-1β* i *CXCR4* između skupina adenokarcinoma pluća s mutacijama i bez mutacija u genu *EGFR*. Kratice: EGFR+, adenokarcinomi pluća s mutacijama u genu *EGFR*; EGFR-, adenokarcinomi pluća bez mutacija u genu *EGFR*; \* $p < 0,05$ .

## 4.2. Imunosni odgovor ispitanika

Imunosni odgovor obje skupine ispitanika s adenokarcinomom pluća procijenjen je analizom udjela limfocitnih potpopulacija u perifernoj krvi. Rezultati za obje skupine prikazani su u Tablici 6.

Udjeli limfocitnih potpopulacija u perifernoj krvi ispitanika s adenokarcinomom pluća s mutacijama u genu *EGFR* pokazali su statistički značajnu negativnu korelaciju između stanica NK i limfocita T ( $p < 0,01$ ), limfocita B ( $p < 0,05$ ), pomoćničkih limfocita T ( $p < 0,05$ ) i citotoksičnih limfocita T ( $p < 0,05$ ). Postotak pomoćničkih limfocita T pozitivno je korelirao s ukupnim brojem limfocita T ( $p < 0,01$ ). Postotak aktiviranih

limfocita T koji ekspimiraju HLA-DR negativno je korelirao s postotkom pomoćničkih limfocita T ( $p<0,05$ ) i limfocita B ( $p<0,05$ ) (Tablica 7).

Udjeli limfocitnih potpopulacija u perifernoj krvi ispitanika s adenokarcinomom pluća bez mutacija u genu *EGFR* pokazali su statistički značajnu negativnu korelaciju između stanica NK i limfocita T i apsolutnog broja pomoćničkih limfocita T ( $p<0,01$ ). Apsolutni broj pomoćničkih limfocita T negativno je korelirao s aktiviranim limfocitima T koji ekspimiraju CD8 i CD38 ( $p<0,05$ ) i aktiviranim limfocitima T koji ekspimiraju HLA-DR ( $p<0,01$ ). Aktivirani limfociti T HLA-DR+ pozitivno su korelirali s aktiviranim limfocitima T koji ekspimiraju CD8 i CD38 ( $p<0,01$ ). Limfociti B negativno su korelirali s limfocitima T ( $p<0,01$ ), posebice s citotoksičnim limfocitima T ( $p<0,01$ ) (Tablica 8).

Usporedbom rezultata analize imunosnog odgovora u perifernoj krvi između skupine ispitanika s adenokarcinomom pluća s mutacijama u genu *EGFR* i skupine ispitanika s adenokarcinomom pluća bez mutacija u genu *EGFR*, značajne razlike u udjelima i korelacijama istraživanih limfocitnih potpopulacija nisu utvrđene (Slika 9 i 10). Također nisu utvrđene značajne razlike u imunosnom odgovoru s obzirom na vrstu mutacije, dob, spol i pušački status ispitanika.

Tablica 6. Udio limfocitnih potpopulacija u perifernoj krvi ispitanika s adenokarcinomom pluća

		Adenokarcinomi pluća s mutacijama u genu <i>EGFR</i>		Adenokarcinomi pluća bez mutacija u genu <i>EGFR</i>	
Potpopulacija limfocita	Udio	Srednja vrijednost	Raspon vrijednosti	Srednja vrijednost	Raspon vrijednosti
Limfociti T	%	67,4	49,3 – 83,3	68,9	39,2 – 86,1
Citotoksični limfociti T	%	23,4	9,2 – 51,8	25,8	6,3 – 55,3
Pomoćnički limfociti T	%	42	19,8 – 58,9	41,2	15,3 – 63,6
Apsolutni broj pomoćničkih limfocita T	/ $\mu$ L krvi	557,7	119 - 1027	611,6	94 - 1298
Stanice NK	%	19,8	5,9 – 38,9	16,6	3 – 35,6
Limfociti B	%	11,4	2,4 – 27,6	12,6	3,1 – 46,5
Aktivirani limfociti T CD8+CD38+	%	5,9	1,4 – 18,5	6,3	1,6 – 38,1
Aktivirani limfociti T HLA-DR+	%	10,7	3 – 28,4	12,4	3,3 – 40,6

Tablica 7. Koeficijenti korelacije postotka limfocitnih potpopulacija kod ispitanika s adenokarcinomom pluća s mutacijama u genu *EGFR*

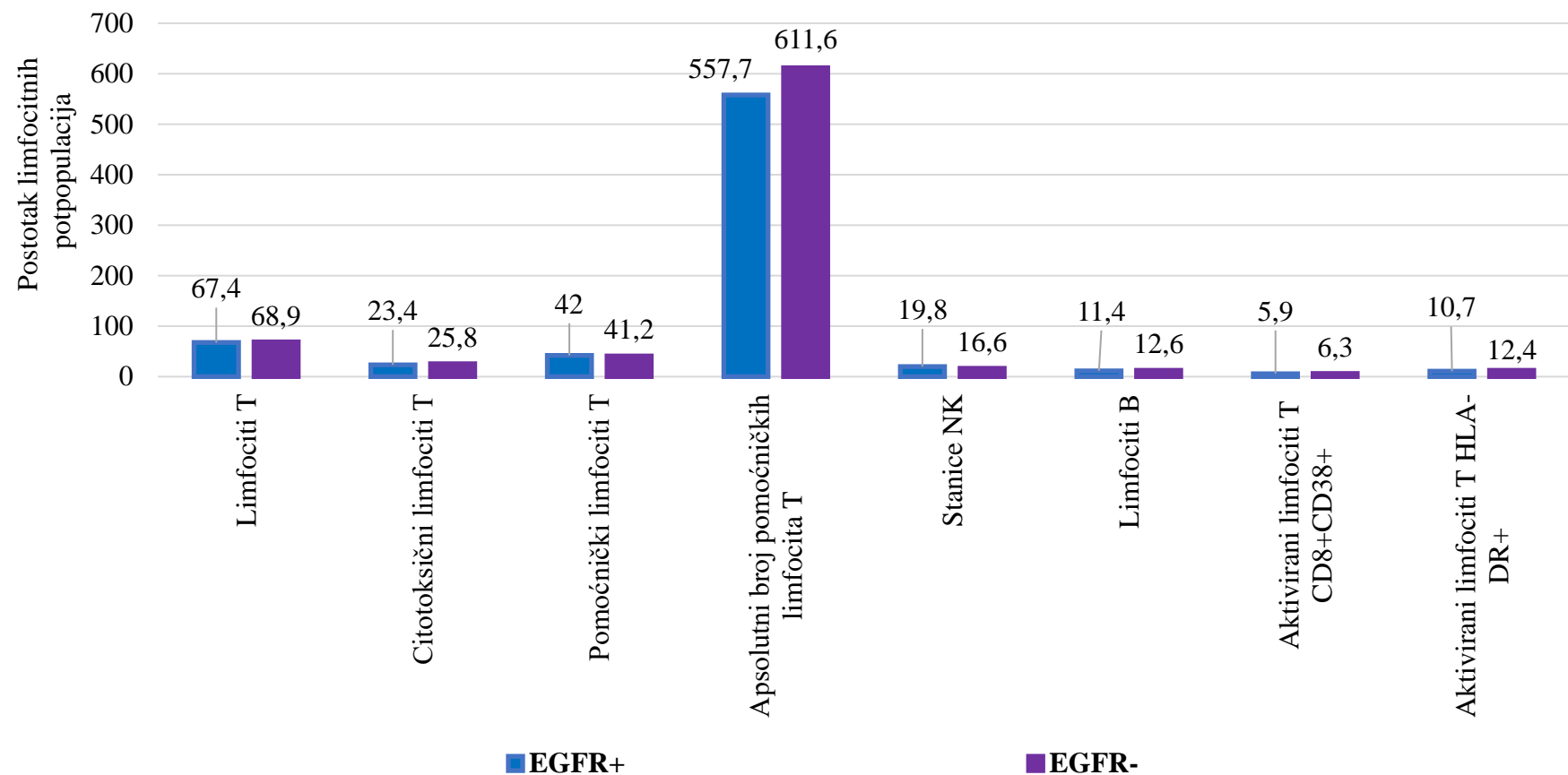
Potpopulacija limfocita	Koeficijent korelacije <sup>1</sup>							
	Limfociti T	Citotoksični limfociti T	Pomoćnički limfociti T	Apsolutni broj pomoćničkih limfocita T	Stanice NK	Limfociti B	Aktivirani limfociti T CD8+CD38+	Aktivirani limfociti T HLA-DR+
Limfociti T	1,000	,535**	,471**	,220	-,795**	-,103	-,016	-,249
Citotoksični limfociti T	,535**	1,000	-,391*	-,105	-,422*	-,166	,287	,208
Pomoćnički limfociti T	,471**	-,391*	1,000	,470*	-,446*	,055	-,250	-,412*
Apsolutni broj pomoćničkih limfocita T	,220	-,105	,470*	1,000	-,167	-,013	-,074	-,302
Stanice NK	-,795**	-,422*	-,446*	-,167	1,000	-,414*	,113	,355
Limfociti B	-,103	-,166	,055	-,013	-,414*	1,000	-,295	-,445*
Aktivirani limfociti T CD8+CD38+	-,016	,287	-,250	-,074	,113	-,295	1,000	,427*
Aktivirani limfociti T HLA-DR+	-,249	,208	-,412*	-,302	,355	-,445*	,427*	1,000

<sup>1</sup>Spearmanov koeficijent korelacije; \*\*p<0,01; \*p<0,05

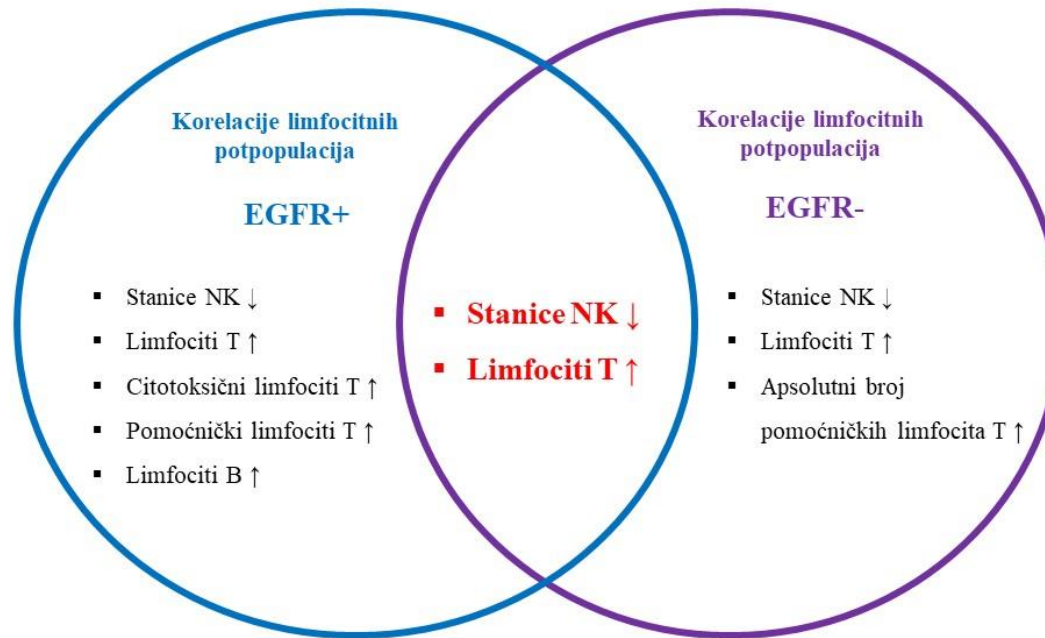
Tablica 8. Koeficijenti korelacije postotka limfocitnih potpopulacija kod ispitanika s adenokarcinomom pluća bez mutacija u genu *EGFR*

Potpopulacija limfocita	Koeficijent korelacije <sup>1</sup>							
	Limfociti T	Citotoksični limfociti T	Pomoćnički limfociti T	Apsolutni broj pomoćničkih limfocita T	Stanice NK	Limfociti B	Aktivirani limfociti T CD8+CD38+	Aktivirani limfociti T HLA-DR+
Limfociti T	1,000	,605**	,325*	,193	-,540**	-,521**	-,065	-,068
Citotoksični limfociti T	,605**	1,000	-,434**	-,149	-,268	-,487**	,304*	,279
Pomoćnički limfociti T	,325*	-,434**	1,000	,398**	-,180	,002	-,408**	-,422**
Apsolutni broj pomoćničkih limfocita T	,193	-,149	,398**	1,000	-,379**	,227	-,328*	-,412**
Stanice NK	-,540**	-,268	-,180	-,379**	1,000	-,251	,209	,257
Limfociti B	-,521**	-,487**	,002	-,227	-,251	1,000	-,272	-,243
Aktivirani limfociti T CD8+CD38+	-,065	,304*	-,408**	-,328*	,209	-,272	1,000	,686**
Aktivirani limfociti T HLA-DR+	-,068	,279	-,422**	-,412**	,257	-,243	,686**	1,000

<sup>1</sup>Spearmanov koeficijent korelacije; \*\*p<0,01; \*p<0,05



Slika 9. Razlike u udjelima limfocitnih potpopulacija u perifernoj krvi između dvije skupine ispitanika s adenokarcinomom pluća. Kratice: EGFR+, adenokarcinomi pluća s mutacijama u genu *EGFR*; EGFR-, adenokarcinomi pluća bez mutacija u genu *EGFR*.



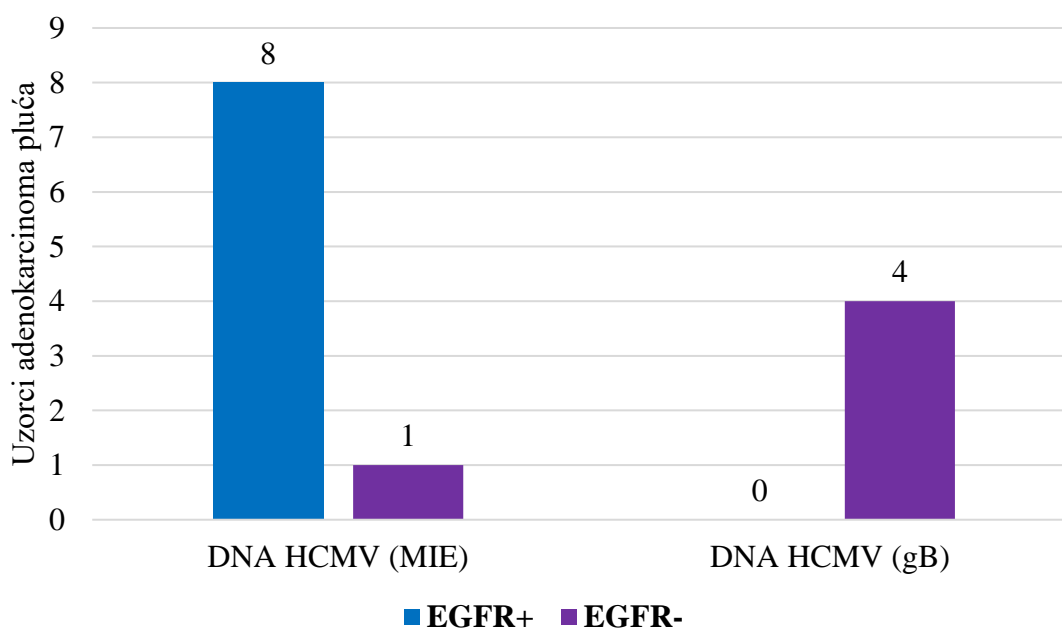
Slika 10. Pojednostavljen prikaz imunskog odgovora u perifernoj krvi ispitanika s adenokarcinomom pluća sa i bez mutacija u genu *EGFR*. Imunosni odgovor temeljen na stanicama NK je niži u odnosu na specifični imunski odgovor unutar kojeg su zastupljeni citotoksični i pomoćnički limfociti T. Kratice: EGFR+, adenokarcinomi pluća s mutacijama u genu *EGFR*; EGFR-, adenokarcinomi pluća bez mutacija u genu *EGFR*; ↑, povišena vrijednost limfocitne potpopulacije; ↓, snižena vrijednost limfocitne potpopulacije.



### 4.3. Analiza infekcije citomegalovirusom

#### 4.3.1. Prisutnost DNA citomegalovirusa

Prisutnost DNA HCMV-a analizirana je u 51-om uzorku adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* i u istom broju uzoraka adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR*. Rezultati analize metodom PCR pokazali su prisutnost DNA HCMV-a u ukupno 13 (12,8%) ispitivanih uzoraka. Virus HCMV detektiran je u osam (15,7%) uzoraka iz skupine adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* i u jednom uzorku iz skupine adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* korištenjem početnica za gen *MIE*. Virus HCMV detektiran je u 4 (7,8%) uzorka adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* korištenjem početnica za gen *gB* (Slika 11).



Slika 11. Prisutnost DNA citomegalovirusa kod adenokarcinoma pluća detektirana korištenjem početnica za gene *MIE* i *gB*. Kratice: EGFR+, adenokarcinomi pluća s mutacijama u genu *EGFR*; EGFR-, adenokarcinomi pluća bez mutacija u genu *EGFR*; HCMV, od eng. *human cytomegalovirus*; *MIE*, neposredno rani geni; *gB*, glikoprotein B.

Statistički značajne razlike u prisutnosti virusne DNA između ispitivanih skupina adenokarcinoma pluća nisu utvrđene. Također nisu utvrđene značajne razlike u prisutnosti DNA HCMV-a s obzirom na vrstu prisutne mutacije, dob, spol i pušački status ispitanika.

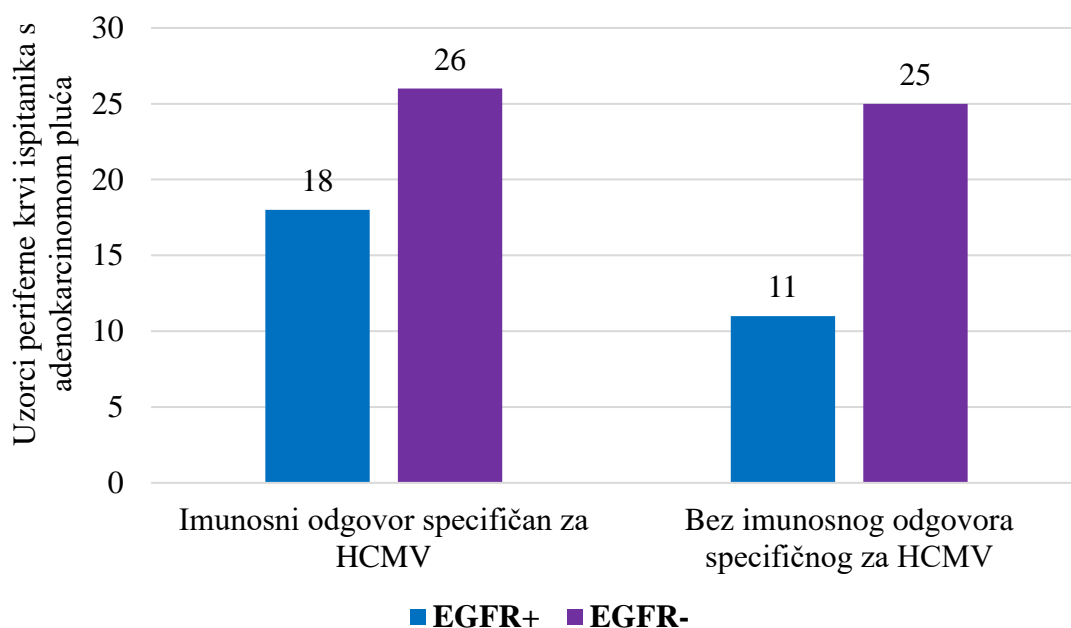
Unutar skupine adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* utvrđena je statistički značajna povezanost između prisutnosti DNA HCMV-a i ekspresije gena *CXCR4* ( $p < 0.05$ ). Utvrđena je prisutnost DNA HCMV-a u tumorskim stanicama koje imaju povišenu razinu ekspresije gena *CXCR4*.

Povezanost između prisutnosti DNA HCMV-a i ekspresije gena *IL-1 $\beta$*  nije utvrđena niti u jednoj ispitivanoj skupini adenokarcinoma pluća.

#### **4.3.2. Imunosni odgovor specifičan za citomegalovirus**

Analiza imunosnog odgovora specifičnog za antigene HCMV-a učinjena je metodom ELISA u perifernoj krvi 29 ispitanika s adenokarcinomom pluća s mutacijama u genu *EGFR* i kod 51-og ispitanika s adenokarcinomom pluća bez mutacija u genu *EGFR*. Imunosni odgovor na antigene HCMV-a utvrđen je kod 18 (62,1%) ispitanika s adenokarcinomom pluća s mutacijama u genu *EGFR* i 26 (50,9%) ispitanika s adenokarcinomom pluća bez mutacija u genu *EGFR* (Slika 12).

Statistički značajne razlike u imunosnom odgovoru specifičnom za HCMV nisu utvrđene između ispitivanih skupina adenokarcinoma pluća. Također nisu utvrđene značajne razlike u imunosnom odgovoru specifičnom za HCMV s obzirom na vrstu mutacije, dob, spol i pušački status ispitanika.



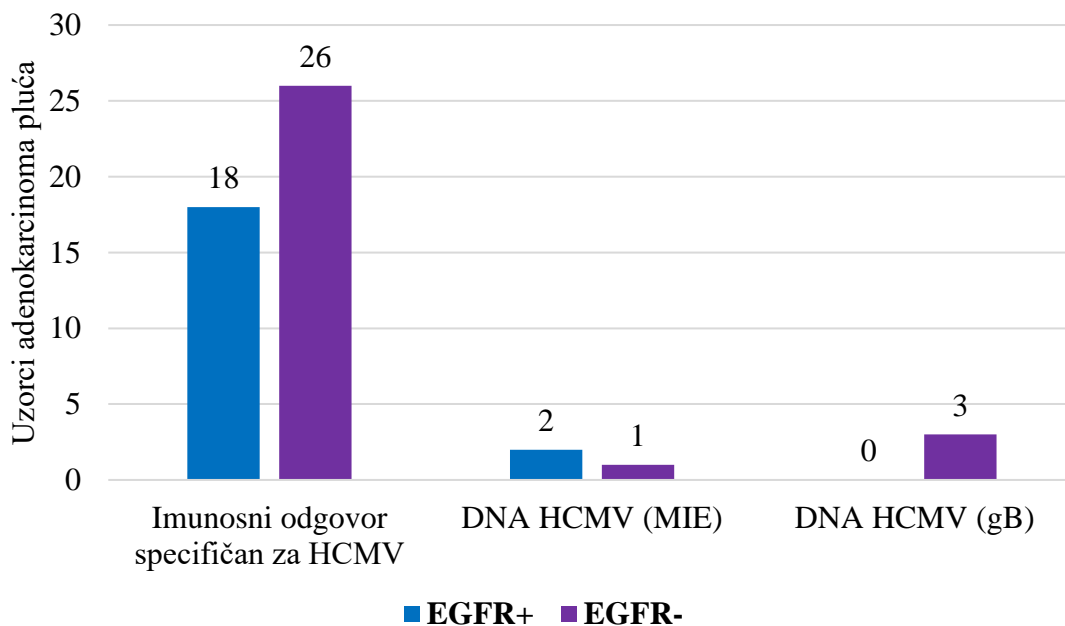
Slika 12. Imunosni odgovor specifičan za citomegalovirus u perifernoj krvi ispitanika s adenokarcinomom pluća sa i bez mutacija u genu *EGFR*. Kratice: EGFR+, adenokarcinomi pluća s mutacijama u genu *EGFR*; EGFR-, adenokarcinomi pluća bez mutacija u genu *EGFR*; HCMV; od eng. *human cytomegalovirus*.

U skupini adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* kod kojih je dokazan imunosni odgovor specifičan za HCMV, DNA HCMV-a utvrđena je u dva uzorka korištenjem početnica za gen *MIE*. U ovoj skupini, DNA HCMV-a nije utvrđena niti u jednom ispitivanom uzorku korištenjem početnica za gen *gB* (Slika 13).

U skupini adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* kod kojih je dokazan imunosni odgovor specifičan za HCMV, DNA HCMV-a utvrđena je u jednom uzorku korištenjem početnica za gen *MIE* i u tri uzorka korištenjem početnica za gen *gB* (Slika 13).

Kod negativnog imunosnog odgovora specifičnog za HCMV, DNA HCMV-a nije utvrđena niti u jednom ispitivanom uzorku adenokarcinoma pluća korištenjem početnica za gen *MIE*, ali je utvrđena u jednom uzorku adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* korištenjem početnica za gen *gB*.

Značajna povezanost između imunološkog odgovora specifičnog za antigene HCMV-a i prisutnosti DNA HCMV-a u tumorskim stanicama nije utvrđena između ispitivanih skupina adenokarcinoma pluća.



Slika 13. Prisutnost DNA citomegalovirusa u dvjema podskupinama adenokarcinoma pluća s imunološkim odgovorom specifičnim za citomegalovirus. Kratice: EGFR+, adenokarcinomi pluća s mutacijama u genu *EGFR*; EGFR-, adenokarcinomi pluća bez mutacija u genu *EGFR*; HCMV, od eng. *human cytomegalovirus*; MIE, neposredno rani geni; gB, glikoprotein B.

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju analizirani su uzorci bolesnika s novootkrivenim adenokarcinomom pluća sa i bez mutacija u genu *EGFR*, kako bi se utvrdile razlike u imunom odgovoru potaknute promjenama transkriptoma tumorskih stanica ili prisutnošću virusa HCMV.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajno višu razinu ekspresije gena *IL-1 $\beta$*  i *CXCR4* u skupini adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* u odnosu na skupinu adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR*.

Interleukin IL-1 $\beta$  važan je medijator upalnog odgovora i ima protumorigenu ulogu kod različitih vrsta karcinoma (Petrella i sur., 2012.; Tan i sur., 2021.). Uključen je u imunosupresiju mikrookoliša tumora tako što potiče neutrofile na inhibiciju citotoksičnih limfocita T, suprimira funkciju stanica NK, i potiče pomoćničke limfocite T na proizvodnju citokina IL-22, što rezultira rastom i širenjem tumora. Polimorfizmi jednog nukleotida gena *IL-1 $\beta$* , G-1464C (rs1143623) i G-3893A (rs12621220) povezani su s povećanom ekspresijom gena *IL-1 $\beta$* , mutacijama gena *TP53*, i povećanim rizikom za nastanak karcinoma pluća nemalih stanica (Garon i sur., 2020.). Ovim istraživanjem utvrđena je devet puta viša razina ekspresije gena *IL-1 $\beta$*  kod skupine adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* u odnosu na skupinu adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR*, što može upućivati na lošiju prognozu u skupini adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR*. Poznato je da IL-1 $\beta$  potiče invaziju i metastaziranje tumorskih stanica te je odgovoran za agresivniji oblik različitih vrsta karcinoma (Tan i sur., 2021.). Visoka razina ekspresije gena *IL-1 $\beta$*  povezana je sa skraćenim preživljenjem kod karcinoma pluća nemalih stanica (Zhang i Veeramachaneni, 2022.). Supresija gena *IL-1 $\beta$*  sprečava metastaziranje tumora u udaljena tkiva i organe te dovodi do smanjenja tumora (de Luca i sur., 2012.; Nguyen i Spranger, 2020.; Tan, 2020.), što ukazuje na ulogu *IL-1 $\beta$*  i njegovih nizvodnih efekatora kao potencijalnih biomarkera kod karcinoma pluća nemalih stanica (Zhang i Veeramachaneni, 2022.). Značajno snižena razina ekspresije gena *IL-1 $\beta$*  kod adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* može biti rezultat povećane kinazne aktivnosti EGFR-a i aktivacije unutarstanične kaskade RAS/RAF/MAPK. Prisutnost mutacija u genu *EGFR* dovodi i do aktivacije signalne

kaskade PI3K/AKT/mTOR preko koje imunosupresivno djeluju brojni citokini poput IL-1 $\beta$ .

Ovim istraživanjem utvrđena je i 19 puta viša razina ekspresije gena *CXCR4* kod skupine adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* u odnosu na skupinu adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR*. Rezultati visoke razine ekspresije gena *CXCR4* povezuju se s udaljenim metastazama i lošim ishodima liječenja kod bolesnika s uznapredovalim tumorima, uključujući karcinom dojke, glave i vrata, jajnika, i karcinom pluća pločastih i nemalih stanica što *CXCR4* čini potencijalnom metom za primjenu pametnih lijekova u terapiji ovih karcinoma (Wald, 2018.; Wang i sur., 2015.; Qiu i sur., 2022.). Kemokinski receptor *CXCR4* i njegov ligand *CXCL12/SDF-1* (*SDF-1*, od *eng. stromal cell-derived factor 1*) omogućuju invaziju i migraciju tumorskih stanica i angiogenezu pomoću aktivacije signala preko signalnog puta koji uključuje PI3K i MAPK (Zhang i sur., 2015.; Lüke i sur., 2018.). Utjecaj kemokinskog receptora *CXCR4* na aktivaciju signala započinje vezanjem *CXCL12* na *CXCR4* koje dovodi do aktivacije signalizacije ovisne o G-proteinu i putovima MAPK, PI3K i PLC (od *eng. phospholipase C*), što rezultira mobilizacijom kalcija, staničnom proliferacijom, diferencijacijom, migracijom i adhezijom. Kemokinski receptor *CXCR4* može formirati heterodimer s *ACKR3* (*CXCR7*), koji doprinosi modulaciji signalizacije *CXCL12/CXCR4* (Shi i sur., 2020.). U T-stanicama, *CXCR4* ulazi u interakciju s *CD3/TSR*. Aktivacija kemokinskog receptora *CXCR4* pomoću *CXCL12* potiče stvaranje imunoloških sinapsa s antigen prezentirajućim stanicama i aktivaciju puta *RAS/ERK*. Interakcija tumorskih stanica s *CXCR4* uzrokuje fosforilaciju *CXCR4-S339*, što dovodi do aktivacije i sinteze *PREX-Rac1*, i sekrecije citokina. U stanicama karcinoma, kemokinski receptor *CXCR4* i *CD47* stvaraju kompleks. Vezanje *CXCR4* i *CXCL12* potiče kointernalizaciju *CXCR4-CD47*. Smanjenje površinskog *CD47* omogućuje fagocitozu tumorskih stanica pomoću makrofaga (Mezzapelle i sur., 2022.). Rezultati ovog istraživanja, u kojem je utvrđena značajno viša razina ekspresije gena *CXCR4* u skupini adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR*, mogu govoriti u prilog lošije prognoze.

Statistički značajne razlike u udjelima analiziranih limfocitnih potpopulacija između ispitivanih skupina adenokarcinoma pluća nisu utvrđene ovim istraživanjem. Međutim, primjećene su niže vrijednosti citotoksičnih limfocita T i više vrijednosti stanica NK u krvi skupine ispitanika s adenokarcinomom pluća s mutacijama u genu

*EGFR* u odnosu na skupinu ispitanika s adenokarcinomom pluća bez mutacija u genu *EGFR*. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su količine limfocita T, citotoksičnih i pomoćničkih limfocita T, i stanica NK u negativnoj korelaciji u perifernoj krvi obje skupine ispitanika s adenokarcinomom pluća ( $p < 0,05$ ). Utvrđen je niži imunski odgovor temeljen na stanicama NK u odnosu na specifični imunski odgovor unutar kojeg su zastupljeni citotoksični i pomoćnički limfociti T, u perifernoj krvi kod obje skupine ispitanika s adenokarcinomom pluća. Reakcija imunskog sustava potiče migraciju većeg broja citotoksičnih limfocita T i stanica NK na mjesto stvaranja tumora, stoga se povišene vrijednosti ovih stanica mogu očekivati u mikrookolišu tumora (Abbas i sur., 2018.). Na mjestima razvoja tumora, povećane koncentracije različitih citokina mogu trajno aktivirati signalne putove poput puta PI3K/AKT/mTOR što pak dovodi do smanjenja broja limfocita T i stanica NK u mikrookolišu tumora (Nguyen i Spranger, 2020.; Tan, 2020.). Fibroblasti povezani s tumorom lučenjem IL-1 $\beta$  mogu potaknuti aktivaciju signalnih putova PI3K i NF- $\kappa$ B unutar tumorskih stanica i također uzrokovati imunosupresiju (Lopez-Castejon i Brough, 2011.). Aktivacija signalnog puta NF- $\kappa$ B može rezultirati i povećanim lučenjem kemokina koji privlače citotoksične limfocite T i omogućuju njihovu infiltraciju na mjesto upale (Hoesel i Schmid, 2013.; Li i sur., 2022.).

Rezultati analize prisutnosti infekcije tumorskih stanica HCMV-om u ovom istraživanju nisu pokazali statistički značajne razlike između ispitivanih skupina adenokarcinoma pluća, za razliku od prije objavljenog istraživanja na manjoj skupini bolesnika (Harabajsa i sur., 2023.). U ovom istraživanju, HCMV je detektiran u 15,7% adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* i kod jednog uzorka adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR*, korištenjem početnica za gen *MIE*. Rezultati detekcije HCMV-a, u ovom istraživanju, niži su u odnosu na rezultate drugog istraživanja kod kojeg je korišten isti set početnica za detekciju gena *MIE* i gdje je on detektiran u 23% ispitanika s karcinomom pluća. U tom istraživanju cilj nije bio istražiti karcinome s mutacijom *EGFR*-a, pa nije poznato koliko od ispitanika s karcinomom pluća kod kojih je utvrđena prisutnost HCMV-a ima i mutaciju u genu *EGFR* (Giuliani i sur., 2007.). Korištenjem početnica za gen *gB*, HCMV je detektiran u 7,8% adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR*, međutim, nije detektiran u skupini adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR*. Rezultati ovog istraživanja pokazuju prisutnost HCMV-a u adenokarcinomu pluća, ali i upozoravaju na pouzdanost detekcije s obzirom na metodu koja se koristi.

U skupini adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* utvrđena je statistički značajna povezanost između više razine ekspresije gena *CXCR4* i infekcije tumorskih stanica HCMV-om. Razlog ove povezanosti mogao bi biti onkogeni potencijal HCMV virusa. Posljedica infekcije HCMV-om ima snažan upalni odgovor s oslobađanjem proupalnih citokina IL-1 i TNF-a (Jarvis i sur., 2006.). Također, virusni IL-10 i US27 omogućuju kontrolu signalizacije CXCL12/CXCR4 i na taj način osiguravaju perzistiranje i širenje HCMV-a. Signalizacija CXCL12/CXCR4 je pojačana u stanicama zaraženim HCMV-om (Tu i sur., 2018.). Virusi se učestalo opisuju kao etiološki faktor u tumorigenezi, međutim, promjene u imunom odgovoru koje mogu biti uzrokovane prisustvom HCMV-a u pozadini adenokarcinoma pluća sa i bez mutacija u genu *EGFR* nisu dovoljno istražene. S obzirom da je kombinacija povišene razine ekspresije gena *CXCR4* i infekcije tumorskih stanica HCMV-om utvrđena kao statistički značajna na malom broju uzoraka adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR*, istraživanje je potrebno proširiti na veći broj ispitanika kako bi se potvrdila uloga HCMV-a u etiologiji ovog podtipa adenokarcinoma pluća. Povezanost između prisutnosti HCMV-a u tumorskim stanicama i razine ekspresije gena *IL-1 $\beta$*  nije utvrđena ovim istraživanjem iako je ona pokazana u prijašnjim radovima (Iwamoto i sur., 1990.; Yang, 2002.). Neki od upalnih procesa povezanih s infekcijom HCMV-om mogu biti posljedica djelovanja produkata HCMV *IE* gena na gen *IL-1 $\beta$*  što može uzrokovati njegovu povećanu ekspresiju (Iwamoto i sur., 1990.). Međutim, ekspresija *IE1* i *IE2*, ovisno o transkripcijskom faktoru Spi/1, može aktivirati mehanizam za potiskivanje ekspresije gena *IL-1 $\beta$*  i ujedno omogućiti HCMV-u izbjegavanje imunog odgovora (Yang, 2002.).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su gotovo jednak postotak slučajeva s imunim odgovorom specifičnim za HCMV u skupini adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* (62,1%) i u skupini adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* (50,9%). Nakon infekcije HCMV-om, dolazi do aktivacije citotoksičnih i pomoćničkih limfocita T i stanica NK kako bi došlo do eliminacije virusa pri čemu se stvara i otpušta citokin IFN- $\gamma$ . Broj citotoksičnih limfocita T specifičnih za HCMV i količina IFN- $\gamma$  omogućuju predviđanje rizika od razvoja HCMV bolesti (Viera Braga i sur., 2015.; Kobayashi i sur., 2017.). Rezultati ovog istraživanja podudaraju se s rezultatima prije objavljenog istraživanja u kojoj prevalencija ovog virusa u populaciji iznosi oko 55%-100% (Zuhair i sur., 2019.). Međutim, rezultati ovog istraživanja nisu u



korelaciji s objavljenim rezultatima seroprevalencije HCMV-a za Republiku Hrvatsku, a koji iznose 74,4% (Vilibic-Cavlek i sur., 2017.). Seroprevalencija HCMV-a u 2017. godini analizirana je na općoj populaciji Republike Hrvatske dok se ovo istraživanje temelji na malom broju oboljelih od adenokarcinoma pluća, čime se mogu objasniti razlike u dobivenim rezultatima.

## 6. ZAKLJUČCI

1. U skupini adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR*, geni *IL-1 $\beta$*  i *CXCR4* značajno su više eksprimirani nego u skupini adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR*.
2. Značajne razlike u imunosnom odgovoru između skupine adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* i skupine adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* nisu utvrđene.
3. Značajna razlika infekcije tumorskih stanica HCMV-om između adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* i adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* nije utvrđena.
4. U skupini adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR*, gen *CXCR4* više je eksprimiran ako su tumorske stanice inficirane HCMV-om.
5. Značajna razlika u imunosnom odgovoru na antigene HCMV-a između adenokarcinoma pluća s mutacijama u genu *EGFR* i adenokarcinoma pluća bez mutacija u genu *EGFR* nije utvrđena.

## 7. POPIS LITERATURE

- Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. (2018) Stanična i molekularna imunologija. 8. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb.
- Ahmed, A. U., Williams, B. R., & Hannigan, G. E. (2015). Transcriptional Activation of Inflammatory Genes: Mechanistic Insight into Selectivity and Diversity. *Biomolecules*, 5(4), 3087–3111.
- Alberg A. J., Brock M. V., Samet J. M. (2016): Epidemiology of Lung Cancer. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine*: 927-939.
- Batinić D. (2005). Laboratorijska dijagnostika imunodeficijenjskih sindroma. *Paediatr Croat*, 49 (Supl 1): 39-47.
- Bisset, L. R., Lung, T. L., Kaelin, M., Ludwig, E., & Dubs, R. W. (2004). Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *European journal of haematology*, 72(3), 203–212.
- Brcic, L., Jakopovic, M., Misic, M., Seiwert, F., Kern, I., Smojver-Jezek, S., Quehenberger, F., Samarzija, M., & Seiwert, S. (2016). Analysis of the frequency of EGFR, KRAS and ALK mutations in patients with lung adenocarcinoma in Croatia. *Diagnostic pathology*, 11(1), 90.
- Bubendorf, L., Büttner, R., Al-Dayel, F., Dietel, M., Elmberger, G., Kerr, K., López-Ríos, F., Marchetti, A., Öz, B., Pauwels, P., Penault-Llorca, F., Rossi, G., Ryška, A., & Thunnissen, E. (2016). Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 469(5), 489–503.
- Buehler, J., Carpenter, E., Zeltzer, S., Igarashi, S., Rak, M., Mikell, I., Nelson, J. A., & Goodrum, F. (2019). Host signaling and EGR1 transcriptional control of human cytomegalovirus replication and latency. *PLoS pathogens*, 15(11), e1008037.
- Buehler, J., Zeltzer, S., Reitsma, J., Petrucelli, A., Umashankar, M., Rak, M., Zagallo, P., Schroeder, J., Terhune, S., & Goodrum, F. (2016). Opposing Regulation of the EGF Receptor: A Molecular Switch Controlling Cytomegalovirus Latency and Replication. *PLoS pathogens*, 12(5), e1005655.

- Bughio, F., Umashankar, M., Wilson, J., & Goodrum, F. (2015). Human Cytomegalovirus UL135 and UL136 Genes Are Required for Postentry Tropism in Endothelial Cells. *Journal of virology*, 89(13), 6536–6550.
- Burger, J. A., & Kipps, T. J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*, 107(5), 1761–1767.
- Chen, H. P., & Chan, Y. J. (2014). The oncomodulatory role of human cytomegalovirus in colorectal cancer: implications for clinical trials. *Frontiers in oncology*, 4, 314.
- Coaquette, A., Bourgeois, A., Dirand, C., Varin, A., Chen, W., & Herbein, G. (2004). Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 39(2), 155–161.
- Coyle, P. V., Wyatt, D. E., Ong, G. M., Maxwell, A. P., McCaughey, C., & O'Neill, H. J. (2002). A nested primer set targeting the cytomegalovirus glycoprotein B gene. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 25(1), 95–96.
- De Luca, A., Maiello, M. R., D'Alessio, A., Pergameno, M., & Normanno, N. (2012). The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16 Suppl 2, S17–S27.
- Dhawan, P., & Richmond, A. (2002). Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *Journal of leukocyte biology*, 72(1), 9–18.
- Dinarello C. A. (2007). Historical insights into cytokines. *European journal of immunology*, 37 Suppl 1(Suppl 1), S34–S45.
- Dubin, S., & Griffin, D. (2020). Lung Cancer in Non-Smokers. *Missouri medicine*, 117(4), 375–379.
- Fairley, J. A., Baillie, J., Bain, M., & Sinclair, J. H. (2002). Human cytomegalovirus infection inhibits epidermal growth factor (EGF) signalling by targeting EGF receptors. *The Journal of general virology*, 83(Pt 11), 2803–2810.
- Falcão A. S. C., da Costa Vasconcelos P. F., Lobato da Silva D. de F., Viana Pinheiro J. de J., Falcão L. F. M., Quaresma J. A. S. (2017). Mechanisms of human

cytomegalovirus infection with a focus on epidermal growth factor receptor interactions. *Reviews in Medical Virology*, 27: e1955.

- Fois, S. S., Paliogiannis, P., Zinellu, A., Fois, A. G., Cossu, A., & Palmieri, G. (2021). Molecular Epidemiology of the Main Druggable Genetic Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 612.
- Fenner, T. E., Garweg, J., Hufert, F. T., Boehnke, M., & Schmitz, H. (1991). Diagnosis of human cytomegalovirus-induced retinitis in human immunodeficiency virus type 1-infected subjects by using the polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 29(11), 2621–2622.
- Freudlsperger, C., Burnett, J. R., Friedman, J. A., Kannabiran, V. R., Chen, Z., & Van Waes, C. (2011). EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: attractive targets for molecular-oriented therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 15(1), 63–74.
- Gabanti, E., Lilleri, D., Scaramuzzi, L., Zelini, P., Rampino, T., & Gerna, G. (2018). Comparison of the T-cell response to human cytomegalovirus (HCMV) as detected by cytokine flow cytometry and QuantiFERON-CMV assay in HCMV-seropositive kidney transplant recipients. *The new microbiologica*, 41(3), 195–202.
- Gaur, P., Bhattacharya, S., Kant, S., Kushwaha, R. A. S., Singh, G., & Pandey, S. (2018). EGFR Mutation Detection and Its Association With Clinicopathological Characters of Lung Cancer Patients. *World journal of oncology*, 9(5-6), 151–155.
- Garon, E. B., Chih-Hsin Yang, J., & Dubinett, S. M. (2020). The Role of Interleukin 1 $\beta$  in the Pathogenesis of Lung Cancer. *JTO clinical and research reports*, 1(1), 100001.
- Giuliani, L., Jaxmar, T., Casadio, C., Gariglio, M., Manna, A., D'Antonio, D., Syrjanen, K., Favalli, C., & Ciotti, M. (2007). Detection of oncogenic viruses SV40, BKV, JCV, HCMV, HPV and p53 codon 72 polymorphism in lung carcinoma. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 57(3), 273–281.
- Goodrum F. (2016). Human Cytomegalovirus Latency: Approaching the Gordian Knot. *Annual review of virology*, 3(1), 333–357.

- Groth, A., Klöss, S., von Strandmann, E. P., Koehl, U., & Koch, J. (2011). Mechanisms of tumor and viral immune escape from natural killer cell-mediated surveillance. *Journal of innate immunity*, 3(4), 344–354.
- Gupta, P., Haldar, D., Naru, J., Dey, P., Aggarwal, A. N., Minz, R. W., & Aggarwal, R. (2016). Prevalence of human papillomavirus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus in fine needle aspirates from lung carcinoma: A case-control study with review of literature. *Diagnostic cytopathology*, 44(12), 987–993.
- Hancock, M. H., Mitchell, J., Goodrum, F. D., & Nelson, J. A. (2020). Human Cytomegalovirus miR-US5-2 Downregulation of GAB1 Regulates Cellular Proliferation and *UL138* Expression through Modulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathways. *mSphere*, 5(4), e00582-20.
- Harabajsa, S., Begić, V., Gršković, P., Šimić, V., Branica, B. V., Badovinac, S., Smojver-Ježek, S., & Korać, P. (2021). Influence of deep-freezing and MGG staining on DNA and RNA quality in different types of lung adenocarcinoma cytological smears. *Diagnostic cytopathology*, 49(12), 1244–1250.
- Harabajsa, S., Milutin, L., Breški, A., Ražnjević, K., Šimić, V., Branica, B. V., & Smojver-Ježek, S. (2023). Quality of cell blocks prepared from residual pleural effusion and bronchial washing samples for immunocytochemistry. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology*, 34(3), 264–270.
- Harabajsa, S., Šefčić, H., Klasić, M., Milavić, M., Židovec Lepej, S., Grgić, I., Zajc Petranović, M., Jakopović, M., Smojver-Ježek, S., & Korać, P. (2023). Infection with human cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and high-risk types 16 and 18 of human papillomavirus in EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Croatian medical journal*, 64(2), 84–92.
- Harrison, P. T., Vyse, S., & Huang, P. H. (2020). Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Seminars in cancer biology*, 61, 167–179.
- Hoesel, B., & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer*, 12, 86.
- Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016., Zagreb, *Bilten* 41, 2019.

- Hughes, C. E., & Nibbs, R. J. B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal*, 285(16), 2944–2971.
- Hutchings, D., Maleki, Z., & Rodriguez, E. F. (2018). Pulmonary Non-Small Cell Carcinoma With Morphologic Features of Adenocarcinoma or "Non-Small Cell Carcinoma Favor Adenocarcinoma" in Cytologic Specimens Share Similar Clinical and Molecular Genetic Characteristics. *American journal of clinical pathology*, 149(6), 514–521.
- Inamura K. (2017). Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Frontiers in oncology*, 7, 193.
- International association for the study of lung cancer. IASLC atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer second edition. Colorado, *Editorial Rx Press*; 2016.
- Iwamoto, G. K., Monick, M. M., Clark, B. D., Auron, P. E., Stinski, M. F., & Hunninghake, G. W. (1990). Modulation of interleukin 1 beta gene expression by the immediate early genes of human cytomegalovirus. *The Journal of clinical investigation*, 85(6), 1853–1857.
- Jafferji, I., Bain, M., King, C., & Sinclair, J. H. (2009). Inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression by human cytomegalovirus correlates with an increase in the expression and binding of Wilms' Tumour 1 protein to the EGFR promoter. *The Journal of general virology*, 90(Pt 7), 1569–1574.
- Jarvis, M. A., Borton, J. A., Keech, A. M., Wong, J., Britt, W. J., Magun, B. E., & Nelson, J. A. (2006). Human cytomegalovirus attenuates interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha proinflammatory signaling by inhibition of NF-kappaB activation. *Journal of virology*, 80(11), 5588–5598.
- Yan, N., Guo, S., Zhang, H., Zhang, Z., Shen, S., & Li, X. (2022). BRAF-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Current Treatment Status and Future Perspective. *Frontiers in oncology*, 12, 863043.
- Yang, Z., Wara-aswapati, N., Yoshida, Y., Walker, N., Galson, D. L., Listman, J., & Auron, P. E. (2002). Dual regulatory role of human cytomegalovirus immediate-early protein in IL1B transcription is dependent upon Spi-1/PU.1. *Biochemical and biophysical research communications*, 294(4), 854–863.
- Yoneda, K., Imanishi, N., Ichiki, Y., & Tanaka, F. (2019). Treatment of Non-small Cell Lung Cancer with EGFR-mutations. *Journal of UOEH*, 41(2), 153–163.

- Janković, M., Samarzija, M., Jakopović, M., Kulis, T., & Znaor, A. (2012). Trends in lung cancer incidence and mortality in Croatia, 1988-2008. *Croatian medical journal*, 53(2), 93–99.
- Jin, J., Hu, C., Wang, P., Chen, J., Wu, T., Chen, W., Ye, L., Zhu, G., Zhang, L., Xue, X., & Shen, X. (2014). Latent infection of human cytomegalovirus is associated with the development of gastric cancer. *Oncology letters*, 8(2), 898–904.
- Jouda, A., McCarthy, C., Fabre, A., & Keane, M. P. (2021). Exosomes: a new perspective in EGFR-mutated lung cancer. *Cancer metastasis reviews*, 40(2), 589–601.
- Khaiboullina, S. F., Maciejewski, J. P., Crapnell, K., Spallone, P. A., Dean Stock, A., Pari, G. S., Zanjani, E. D., & Jeor, S. S. (2004). Human cytomegalovirus persists in myeloid progenitors and is passed to the myeloid progeny in a latent form. *British journal of haematology*, 126(3), 410–417.
- Khan, M. A., & Khan, A. (2021). Role of NKT Cells during Viral Infection and the Development of NKT Cell-Based Nanovaccines. *Vaccines*, 9(9), 949.
- Kidane, D., Chae, W. J., Czocho, J., Eckert, K. A., Glazer, P. M., Bothwell, A. L., & Sweasy, J. B. (2014). Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(2), 116–139.
- Kim, Y., Pierce, C. M., & Robinson, L. A. (2018). Impact of viral presence in tumor on gene expression in non-small cell lung cancer. *BMC cancer*, 18(1), 843.
- Kobayashi, T., Sato, J. I., Ikuta, K., Kanno, R., Nishiyama, K., Koshizuka, T., Ishioka, K., & Suzutani, T. (2017). Modification of the HCMV-specific IFN- $\gamma$  release test (QuantiFERON-CMV) and a novel proposal for its application. *Fukushima journal of medical science*, 63(2), 64–74.
- Li, M., Liu, P., Wang, B., Zhou, J., & Yang, J. (2022). Inhibition of Nuclear Factor Kappa B as a Therapeutic Target for Lung Cancer. *Alternative therapies in health and medicine*, 28(1), 44–51.
- Li, R., Ong, S. L., Tran, L. M., Jing, Z., Liu, B., Park, S. J., Huang, Z. L., Walser, T. C., Heinrich, E. L., Lee, G., Salehi-Rad, R., Crosson, W. P., Pagano, P. C., Paul, M. K., Xu, S., Herschman, H., Krysan, K., & Dubinett, S. (2020). Chronic IL-1 $\beta$ -



induced inflammation regulates epithelial-to-mesenchymal transition memory phenotypes via epigenetic modifications in non-small cell lung cancer. *Scientific reports*, 10(1), 377.

- Lin, J. J., & Shaw, A. T. (2017). Recent Advances in Targeting ROS1 in Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 12(11), 1611–1625.
- Lindeman, N. I., Cagle, P. T., Aisner, D. L., Arcila, M. E., Beasley, M. B., Bernicker, E. H., Colasacco, C., Dacic, S., Hirsch, F. R., Kerr, K., Kwiatkowski, D. J., Ladanyi, M., Nowak, J. A., Sholl, L., Temple-Smolkin, R., Solomon, B., Souter, L. H., Thunnissen, E., Tsao, M. S., Ventura, C. B., ... Yatabe, Y. (2018). Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 142(3), 321–346.
- Liu, H., Yang, Z., Lu, W., Chen, Z., Chen, L., Han, S., Wu, X., Cai, T., & Cai, Y. (2020). Chemokines and chemokine receptors: A new strategy for breast cancer therapy. *Cancer medicine*, 9(11), 3786–3799.
- Liu, Y., Tavana, O., & Gu, W. (2019). p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian. *Journal of molecular cell biology*, 11(7), 564–577.
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(4), 189–195.
- Lozano, M. D., Echeveste, J. I., Abengozar, M., Mejías, L. D., Idoate, M. A., Calvo, A., & de Andrea, C. E. (2018). Cytology Smears in the Era of Molecular Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer: Doing More With Less. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 142(3), 291–298.
- Lüke, F., Blazquez, R., Yamaci, R. F., Lu, X., Pregler, B., Hannus, S., Menhart, K., Hellwig, D., Wester, H. J., Kropf, S., Heudobler, D., Grosse, J., Moosbauer, J., Hutterer, M., Hau, P., Riemenschneider, M. J., Bayerlová, M., Bleckmann, A., Polzer, B., Beißbarth, T., ... Pukrop, T. (2018). Isolated metastasis of an EGFR-L858R-mutated NSCLC of the meninges: the potential impact of

CXCL12/CXCR4 axis in EGFR<sub>mut</sub> NSCLC in diagnosis, follow-up and treatment. *Oncotarget*, 9(27), 18844–18857.

- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *The European respiratory journal*, 48(3), 889–902.
- Marušić-Galesić, S., Stephany, D. A., Longo, D. L., & Kruisbeek, A. M. (1988). Development of CD4-CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells requires interactions with class I MHC determinants. *Nature*, 333(6169), 180–183.
- Maussang, D., Verzijl, D., van Walsum, M., Leurs, R., Holl, J., Pleskoff, O., Michel, D., van Dongen, G. A., & Smit, M. J. (2006). Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13068–13073.
- Medzhitov, R., & Janeway, C., Jr (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological reviews*, 173, 89–97.
- Mezzapelle, R., Leo, M., Caprioglio, F., Colley, L. S., Lamarca, A., Sabatino, L., Colantuoni, V., Crippa, M. P., & Bianchi, M. E. (2022). CXCR4/CXCL12 Activities in the Tumor Microenvironment and Implications for Tumor Immunotherapy. *Cancers*, 14(9), 2314.
- Michaelis, M., Doerr, H. W., & Cinatl, J. (2009). The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 11(1), 1–9.
- Miller, M. C., & Mayo, K. H. (2017). Chemokines from a Structural Perspective. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2088.
- Miliani de Marval, P. L., & Zhang, Y. (2011). The RP-Mdm2-p53 pathway and tumorigenesis. *Oncotarget*, 2(3), 234–238.
- Mlera, L., Moy, M., Maness, K., Tran, L. N., & Goodrum, F. D. (2020). The Role of the Human Cytomegalovirus *UL133-UL138* Gene Locus in Latency and Reactivation. *Viruses*, 12(7), 714.
- Mohar, B., Smojver Ježek, S., Rajković Molek, K., Štemberger, C., Kurpis, M., Kupanovac, Ž., Samaržija, M., Jonjić, N., & Grahovac, B. (2016). Detection of an EGFR mutation in cytological specimens of lung adenocarcinoma.

*Cytopathology: official journal of the British Society for Clinical Cytology*, 27(6), 444–451.

- Mohrherr, J., Haber, M., Breitenecker, K., Aigner, P., Moritsch, S., Voronin, V., Eferl, R., Moriggl, R., Stoiber, D., Györfly, B., Brcic, L., László, V., Döme, B., Moldvay, J., Dezsó, K., Bilban, M., Popper, H., Moll, H. P., & Casanova, E. (2019). JAK-STAT inhibition impairs K-RAS-driven lung adenocarcinoma progression. *International journal of cancer*, 145(12), 3376–3388.
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008). Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic proceedings*, 83(5), 584–594.
- Mui U. N., Haley C. T., Tying S. K. (2017): Viral Oncology: Molecular Biology and Pathogenesis. *Journal of clinical medicine*, 6: 111.
- Murugesan, S., Murugesan, J., Palaniappan, S., Palaniappan, S., Murugan, T., Siddiqui, S. S., & Loganathan, S. (2021). Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) in Lung Cancer Treatment: A Comprehensive Analysis. *Current cancer drug targets*, 21(1), 55–69.
- Nguyen, A. H., Berim, I. G., & Agrawal, D. K. (2014). Cellular and molecular immunology of lung cancer: therapeutic implications. *Expert review of clinical immunology*, 10(12), 1711–1730.
- Nguyen, K. B., & Spranger, S. (2020). Modulation of the immune microenvironment by tumor-intrinsic oncogenic signaling. *The Journal of cell biology*, 219(1), e201908224.
- O'Brien, S. M., Klampatsa, A., Thompson, J. C., Martinez, M. C., Hwang, W. T., Rao, A. S., Standalick, J. E., Kim, S., Cantu, E., Litzky, L. A., Singhal, S., Eruslanov, E. B., Moon, E. K., & Albelda, S. M. (2019). Function of Human Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer immunology research*, 7(6), 896–909.
- Opal, S. M., & DePalo, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4), 1162–1172.
- Petrella, B. L., Armstrong, D. A., & Vincenti, M. P. (2012). Interleukin-1 beta and transforming growth factor-beta 3 cooperate to activate matrix metalloproteinase

- expression and invasiveness in A549 lung adenocarcinoma cells. *Cancer letters*, 325(2), 220–226.
- Tan, Q., Duan, L., Huang, Q., Chen, W., Yang, Z., Chen, J., & Jin, Y. (2021). Interleukin -1 $\beta$  Promotes Lung Adenocarcinoma Growth and Invasion Through Promoting Glycolysis via p38 Pathway. *Journal of inflammation research*, 14, 6491–6509.
  - Qiu, L., Xu, Y., Xu, H., & Yu, B. (2022). The clinicopathological and prognostic value of CXCR4 expression in patients with lung cancer: a meta-analysis. *BMC cancer*, 22(1), 681.
  - Raval, R. R., Sharabi, A. B., Walker, A. J., Drake, C. G., & Sharma, P. (2014). Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *Journal for immunotherapy of cancer*, 2, 14.
  - Roh M. H. (2019). The utilization of cytologic and small biopsy samples for ancillary molecular testing. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 32(Suppl 1), 77–85.
  - Schmitt, F., Yang, Z., & Esebua, M. (2022). Molecular testing in cytology. *Diagnostic Cytopathology*, 51, 3 - 4.
  - Shi, Y., Riese, D. J., 2nd, & Shen, J. (2020). The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. *Frontiers in pharmacology*, 11, 574667.
  - Skoog, L., & Tani, E. (2011). Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology: official journal of the British Society for Clinical Cytology*, 22(4), 215–229.
  - Söderberg-Nauclér C. (2006). Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer?. *Journal of internal medicine*, 259(3), 219–246.
  - Soroceanu, L., & Cobbs, C. S. (2011). Is HCMV a tumor promoter?. *Virus research*, 157(2), 193–203.
  - Syahrudin, E., Wulandari, L., Sri Muktiati, N., Rima, A., Soeroso, N., Ermayanti, S., Levi, M., Hidajat, H., Widjajahakim, G., & Utomo, A. R. H. (2018). Uncommon *EGFR* mutations in cytological specimens of 1,874 newly

- diagnosed Indonesian lung cancer patients. *Lung Cancer (Auckland, N.Z.)*, 9, 25–34.
- Stinski, M. F., & Isomura, H. (2008). Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency. *Medical microbiology and immunology*, 197(2), 223–231.
  - Stumpf, C., Kaemmerer, D., Neubauer, E., Sanger, J., Schulz, S., & Lupp, A. (2018). Somatostatin and CXCR4 expression patterns in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung relative to small cell lung cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 144(10), 1921–1932.
  - Sun, H., Liu, S. Y., Zhou, J. Y., Xu, J. T., Zhang, H. K., Yan, H. H., Huan, J. J., Dai, P. P., Xu, C. R., Su, J., Guan, Y. F., Yi, X., Yu, R. S., Zhong, W. Z., & Wu, Y. L. (2020). Specific TP53 subtype as biomarker for immune checkpoint inhibitors in lung adenocarcinoma. *EBioMedicine*, 60, 102990.
  - Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
  - Šutić, M., Vukić, A., Baranašić, J., Försti, A., Džubur, F., Samaržija, M., Jakopović, M., Brčić, L., & Knežević, J. (2021). Diagnostic, Predictive, and Prognostic Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Management. *Journal of personalized medicine*, 11(11), 1102.
  - Takanami I. (2003). Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *International journal of cancer*, 105(2), 186–189.
  - Taher, C., de Boniface, J., Mohammad, A. A., Religa, P., Hartman, J., Yaiw, K. C., Frisell, J., Rahbar, A., & Söderberg-Naucler, C. (2013). High prevalence of human cytomegalovirus proteins and nucleic acids in primary breast cancer and metastatic sentinel lymph nodes. *PloS one*, 8(2), e56795.
  - Tan A. C. (2020). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thoracic cancer*, 11(3), 511–518.
  - Tan, Q., Huang, Y., Deng, K., Lu, M., Wang, L., Rong, Z., Zhao, W., Li, S., Xu, Z., Fan, L., Li, K., & Li, Z. (2020). Identification immunophenotyping of lung

- adenocarcinomas based on the tumor microenvironment. *Journal of cellular biochemistry*, 121(11), 4569–4579.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., Beer, D. G., Powell, C. A., Riely, G. J., Van Schil, P. E., Garg, K., Austin, J. H., Asamura, H., Rusch, V. W., Hirsch, F. R., Scagliotti, G., Mitsudomi, T., Huber, R. M., Ishikawa, Y., Jett, J., Yankelewitz, D. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 6(2), 244–285.
  - Tu, C. C., Arnolds, K. L., O'Connor, C. M., & Spencer, J. V. (2018). Human Cytomegalovirus UL111A and US27 Gene Products Enhance the CXCL12/CXCR4 Signaling Axis via Distinct Mechanisms. *Journal of virology*, 92(5), e01981-17.
  - Vieira Braga, F. A., Hertoghs, K. M., van Lier, R. A., & van Gisbergen, K. P. (2015). Molecular characterization of HCMV-specific immune responses: Parallels between CD8(+) T cells, CD4(+) T cells, and NK cells. *European journal of immunology*, 45(9), 2433–2445.
  - Vilibic-Cavlek, T., Kolaric, B., Belder, N., Vrtar, I., Tabain, I., & Mlinaric-Galinovic, G. (2017). Seroepidemiology of cytomegalovirus infections in Croatia. *Wiener klinische Wochenschrift*, 129(3-4), 129–135.
  - Wald O. (2018). CXCR4 Based Therapeutics for Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Journal of clinical medicine*, 7(10), 303.
  - Wang, H., Xie, F., Hu, Z., & Chen, L. (2015). Elevated expression of CXCR4 and correlation with clinicopathological features and prognosis of non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Genetics and molecular research: GMR*, 14(4), 17893–17903.
  - Wei, X. W., Deng, J. Y., Xu, C. R., Chen, Z. H., Zhu, D. Q., Wu, Q., Zhang, X. C., Wu, Y. L., & Zhou, Q. (2022). Characteristics of and Treatment Strategies for Advanced *EGFR*-Mutant NSCLC With Concomitant *BRAF* Variations. *JTO clinical and research reports*, 3(7), 100348.

- WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Thoracic tumours*. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021.
- Wolf, N. K., Kissiov, D. U., & Raulet, D. H. (2023). Roles of natural killer cells in immunity to cancer, and applications to immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 23(2), 90–105.
- Zhang, Z., Stiegler, A. L., Boggan, T. J., Kobayashi, S., & Halmos, B. (2010). EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget*, 1(7), 497–514.
- Zhang, C., Li, J., Han, Y., & Jiang, J. (2015). A meta-analysis for CXCR4 as a prognostic marker and potential drug target in non-small cell lung cancer. *Drug design, development and therapy*, 9, 3267–3278.
- Zhang, J., & Veeramachaneni, N. (2022). Targeting interleukin-1 $\beta$  and inflammation in lung cancer. *Biomarker research*, 10(1), 5.
- Zhang, J. J., Liu, W., Xing, G. Z., Xiang, L., Zheng, W. M., & Ma, Z. L. (2022). Role of CC-chemokine ligand 2 in gynecological cancer. *Cancer cell international*, 22(1), 361.
- Zuhair, M., Smit, G. S. A., Wallis, G., Jabbar, F., Smith, C., Devleeschauwer, B., & Griffiths, P. (2019). Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Reviews in medical virology*, 29(3), e2034.

## 8. PRILOG

Prilog 1. Prikaz razmještaja uzoraka, mitogena, negativnih kontrola i standarda u analizi testom QuantiFERON CMV ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1N	3N	5N	7N	9N	<i>S1</i>	<i>S1</i>	13N	15N	17N	19N	21N
<b>B</b>	1CMV1	3CMV1	5CMV1	7CMV1	9CMV1	<i>S2</i>	<i>S2</i>	13CMV1	15CMV1	17CMV1	19CMV1	21CMV1
<b>C</b>	1CMV2	3CMV2	5CMV2	7CMV2	9CMV2	<i>S3</i>	<i>S3</i>	13CMV2	15CMV2	17CMV2	19CMV2	21CMV2
<b>D</b>	1M	3M	5M	7M	9M	<i>S4</i>	<i>S4</i>	13M	15M	17N	19M	21M
<b>E</b>	2N	4N	6N	8N	10N	11N	12N	14N	16N	18M	20N	22N
<b>F</b>	2CMV1	4CMV1	6CMV1	8CMV1	10CMV1	11CMV1	12CMV1	14CMV1	16CMV1	18CMV1	20CMV1	22CMV1
<b>G</b>	2CMV2	4CMV2	6CMV2	8CMV2	10CMV2	11CMV2	12CMV2	14CMV2	16CMV2	18CMV2	20CMV2	22CMV2
<b>H</b>	2M	4M	6M	8M	10M	11M	12M	14M	16N	18M	20M	22M

S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4); 1 N (Uzorak 1. Nil plazma), 1CMV1 (Uzorak 1. CMV1 plazma), 1CMV2 (Uzorak 1. CMV2 plazma), 1 M (Uzorak 1. Mitogen plazma)



## 9. ŽIVOTOPIS AUTORA

Suzana Harabajska rođena je 26. lipnja, 1979. u Zagrebu, gdje je završila osnovnu i srednju školu te Zdravstveno veleučilište, smjer medicinsko - laboratorijska dijagnostika. Svoje obrazovanje nastavila je na Medicinskom fakultetu i Fakultetu zdravstvenih studija Sveučilišta u Rijeci te 2015. godine stekla zvanje magistra medicinsko-laboratorijske dijagnostike. Edukaciju za trajnu izobrazbu citotehnologa završila je 2008. godine. Poslijediplomski doktorski studij Biologija upisala je akademske godine 2016./2017. na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Svoje iskustvo iz područja citodijagnostike stjecala je u Laboratoriju za internu citologiju i hematologiju KB Merkur, u Laboratoriju za citologiju i medicinsku genetiku na Klinici za ženske bolesti i porode KB Merkur, i u Odjelu za pulmološku citologiju KBC-a Zagreb gdje od 2012. godine obnaša dužnost glavnog inženjera Odjela. U naslovno zvanje asistenta na katedri za patologiju Zdravstvenog veleučilišta u Zagrebu izabrana je 2018. godine, a u naslovno zvanje predavača 2023. godine. Aktivni je član nekoliko stručnih hrvatskih i inozemnih organizacija (Hrvatska udruga citotehnologa, Hrvatsko torakalno društvo, Hrvatsko društvo za istraživanje raka, European association for cancer research, British association for cytopathology), a od 2015. do 2022. godine obnašala je dužnost predsjednice Hrvatske udruge citotehnologa. Sudjelovala je u organizaciji nekoliko hrvatskih i jednog europskog kongresa kliničke citologije. Prvi je autor pet objavljenih publikacija i preko trideset kongresnih sažetaka, te jedna od autorica udžbenika iz kliničke citologije za studente Zdravstvenog veleučilišta u Zagrebu. Primila je nagradu za najbolje kongresno usmeno priopćenje iz područja citotehnologije (Opatija, 2005.), nagradu za najbolje postersko priopćenje iz područja biologije na simpoziju studenata doktorskih studija Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Zagreb, 2020.) i nagradu za najbolji znanstveni rad na kongresu u organizaciji Hrvatskog torakalnog društva (Zagreb, 2023.).