

Nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžiu sergančiųjų PD-L1 raiškos, naviko mikroaplinkos ir genetinio profilio tyrimas

PD-L1 EXPRESSION, TUMOUR IMMUNE MICROENVIRONMENT
AND COMPREHENSIVE GENOMIC PROFILING IN PATIENTS WITH
NON-SMALL CELL LUNG CANCER

GIEDRĖ GUREVIČIENĖ
LSMU MA Pulmonologijos klinika

Santrauka. 2025 m. rugsėjo 18 d. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto viešajame Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje Giedrė Gurevičienė sėkmingai apgynė daktaro disertaciją „Nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžiu sergančiųjų PD-L1 raiškos, naviko mikroaplinkos ir genetinio profilio tyrimas“. Disertacija rengta 2018–2024 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Pulmonologijos klinikoje. Šiame straipsnyje pateikiami pagrindiniai disertacijos rezultatai.

Mokslinis vadovas:

prof. dr. Marius Žemaitis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacijos gynimo taryba:

prof. Rasa Ugenskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

prof. dr. Arschang Valipour (Karlo Landšteinerio plaučių tyrimų ir onkologinių plaučių ligų institutas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

prof. dr. Edvardas Danila (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

doc. dr. Dainius Jančiauskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

dr. Erika Korobeinikova (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Summary. Giedrė Gurevičienė successfully defended a doctoral dissertation “PD-L1 expression, tumour immune microenvironment and comprehensive genomic profiling in patients with non-small cell lung cancer” at the open session of the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on September 23, 2024. The dissertation has been prepared at the Department of Pulmonology at the Medical Academy of the Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2018–2024 year. The article presents the main results of the dissertation.

Scientific Supervisor:

Prof. Dr. Marius Žemaitis (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

The Defense Council:

Prof. Rasa Ugenskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Prof. Dr. Arschang Valipour (Karl-Landsteiner-Institute for Lung Research and Pulmonary Oncology, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Prof. Dr. Edvardas Danila (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Doc. Dr. Dainius Jančiauskas (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Dr. Erika Korobeinikova (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

DOI: <https://doi.org/10.37499/PIA.1891>

IVADAS

Plaučių vėžys išlieka viena dažniausių onkologinių ligų ir pagrindine mirtingumo nuo vėžio priežastimi [1]. Nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžys (NSLPV) sudaro iki 80 proc. visų plaučių vėžio atvejų. Tai heterogeniška ir mutageniška liga, pasižyminti onkogeni-

nėmis mutacijomis ir sudėtingais imuninės sistemos išvengimo mechanizmais.

Imuninės sistemos kontrolės taškų – programuotos ląstelių žūties receptoriaus 1 (PD-1) ir programuotos ląstelių žūties ligando 1 (PD-L1) – atradimas bei imunoterapijos (anti-PD-1, anti-PD-L1) taikymas

reikšmingai pagerino pacientų, sergančių NSLPV, gydymo rezultatus, tačiau atsakas stebimas tik daliai pacientų [2, 3]. PD-L1 inhibitorių veikimo mechanizmas grindžiamas PD-L1 ir PD-1 sąveikos blokavimu T ląstelėse, atkuriant antinavikinį imuninį atsaką [4]. Nors PD-L1 raiška yra vienintelis kliniškai patvirtintas žymuo, taikomas atrenkant NSLPV sergančius pacientus imunoterapijai, jo prognostinė ir predikcinė vertė yra ribota: atsakas į gydymą galimas ir esant neigiamai PD-L1 raiškai, o kai kuriais atvejais gydymas būna neveiksmingas net esant aukštai raiškai [5, 6]. Nustatyta, kad imuninės ląstelės, pasižyminčios PD-L1 raiška, prisideda prie T ląstelių antinavikinio atsako slopinimo ir padeda navikinėms ląstelėms išvengti imuninės sistemos kontrolės. Šių procesų mechanizmai neviseiškai aiškūs, o dauguma tyrimų atlikta metastazavusio NSLPV atveju [5–7]. Klinikinėje praktikoje stebima, kad ankstyvosioms NSLPV stadijoms būdinga mažesnė PD-L1 raiška nei vėlyvosioms, todėl galima daryti prielaidą, kad naviko PD-L1 raiškos ryšiai su naviko mikroaplinka gali skirtis priklausomai nuo ligos stadijos, tačiau duomenys išlieka fragmentiški [3, 8, 9]. Be to, nustatyta, kad naviko vystymuisi ir augimui svarbus ne tik imuninių ląstelių buvimas, bet ir jų erdvinis pasiskirstymas naviko audinyje [10].

Naudojant naujos kartos sekoskaitos metodus, atlikus įvairių vėžio tipų genetinio profilio analizę, nustatyta, kad tam tikri genetiniai pokyčiai ir TMB gali būti susiję su pacientų atsaku į gydymą ir prognoze, tačiau rezultatai išlieka prieštaringi [11–14]. Taip pat nustatytas ryšys tarp tam tikrų genetinių pokyčių, PD-L1 raiškos ir TMB lygio [15]. Kai kurios genetinės mutacijos siejamos su atsparumu gydymui ir greitu ligos progresavimu [1, 16].

Remiantis šiais duomenimis, PD-L1 raiškos, naviko mikroaplinkos, genetinių pokyčių ir TMB tarpusavio ryšių analizė gali padėti geriau suprasti mechanizmus, kuriais navikas geba išvengti imuninės sistemos priežiūros, ir prisidėti prie naujų prognostinių bei predikcinių žymenų, svarbių gydant NSLPV, nustatymo.

Tyrimo tikslas – įvertinti pacientų, sergančių ankstyvosios stadijos ir išplitusiu NSLPV, PD-L1 raišką, naviko mikroaplinką ir genetinį profilį.

Tyrimo uždaviniai:

1. Įvertinti ankstyvosios stadijos NSLPV sergančių pacientų, kuriems taikytas chirurginis gydymas, navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raišką bei nustatyti jų ryšį su klinikiniais pacientų duomenimis, morfologinėmis naviko savybėmis ir naviką infiltruojančiomis imuninėmis ląstelėmis.
2. Nustatyti ryšį tarp navikinių ir imuninių ląstelių, pasižyminčių PD-L1 raiška, pasiskirstymo naviko mikroaplinkoje ir naviko imuninių fenotipų

pacientams, kuriems dėl ankstyvosios stadijos NSLPV atliktas chirurginis gydymas.

3. Įvertinti metastazavusiu NSLPV sergančių pacientų navikinių ląstelių PD-L1 raišką ir naviko genominį profilį.
4. Įvertinti išplitusiu NSLPV sergančių pacientų navikinių ląstelių PD-L1 raiškos ryšius su klinikiniais duomenimis, morfologinėmis naviko savybėmis, genetiniais pokyčiais ir TMB.
5. Įvertinti navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiškos, naviko imuninės mikroaplinkos ir genomio profilio prognostinę ir predikcinę reikšmę pacientams, sergantiems ankstyvosios stadijos ir metastazavusiu NSLPV.

Tyrimo naujumas

Imunoterapija žengia į naują etapą – nuo išplitusio ir metastazavusio NSLPV gydymo pereinama prie ankstyvųjų ligos stadijų gydymo, siekiant prailginti pacientų išgyvenamumą ir atitolinti ligos atsinaujinimą [3, 8, 9, 17–19]. Vis dėlto, kaip ir metastazavusio NSLPV atveju, šios terapijos veiksmingumas ankstyvosioms ligos stadijoms išlieka ribotas. Imunoterapija, taikant anti-PD-1 / anti-PD-L1 preparatus, pagrįsta T limfocitų reaktyvacija po antikūnų prisijungimo prie PD-1 / PD-L1 receptorių, kurie dažniausiai ekspresuojami naviko ląstelėse [4]. Tolesni tyrimai atskleidė netradicinę PD-1 / PD-L1 kelio funkcinę ašį, pabrėžiančią naviką infiltruojančių imuninių ląstelių, ypač limfocitų ir makrofagų, reikšmę naviko mikroaplinkoje [20]. Vis dėlto mokslinių duomenų apie PD-L1 raišką ir jos ryšius su naviko mikroaplinka ankstyvųjų stadijų NSLPV atvejais stinga. Kiek žinoma, tai yra pirmasis tyrimas, kuriame atlikta išsami PD-L1 raiškos ryšių su naviko mikroaplinka analizė. Tyrimas apima platų naviką infiltruojančių imuninių ląstelių spektrą, taip pat vertinamas ryšys tarp jų pasiskirstymo naviko parenchimoje ir stromoje su navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiška. Atsižvelgiant į imuninių ląstelių pasiskirstymą naviko mikroaplinkoje, nustatomi skirtingi imuniniai fenotipai ir jų ryšys su navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiška.

Be to, ribotas imunoterapijos (anti-PD-1 / anti-PD-L1) veiksmingumas, sergant NSLPV, dažnai siejamas su pirminiu atsparumu ir greitu ligos progresavimu [16, 21]. Naujos kartos sekoskaita padeda identifikuoti su šiais procesais susijusius genetinius pokyčius, todėl šiame tyrime papildomai atlikta PD-L1 raiškos ir genetinio profilio analizė, ypatingą dėmesį skiriant pacientams, kuriems nustatytas greitas ligos progresavimas.

METODAI IR TYRIMO EIGA

Į tyrimą įtraukti 122 pacientai, kuriems nustatytas NSLPV. Tyrimą sudarė retrospektyvioji ir perspektyvioji dalys (1 pav.). Jis atliktas 2018–2025 m. Kauno

klinikų Pulmonologijos ir Patologijos klinikose. Tyrimo protokolą patvirtino Kauno regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas (protokolo Nr. BE-2-44). Visi dalyviai pasirašė informuoto sutikimo formą, išskyrus retrospektyviosios dalies pacientus, mirusius iki tyrimo pradžios.

Į tyrimą įtraukti 18–99 metų pacientai (vyrai ir moterys), kuriems histologiškai patvirtintas NSLPV, gautas pakankamas histologinės medžiagos kiekis imunohistocheminiam tyrimui ir naujos kartos sekoskaitai atlikti, nenustatyta EGFR geno mutacija (metastazavusio plaučių vėžio atveju) ir gautas informuoto asmens sutikimas.

Į tyrimą neįtraukti pacientai, kuriems per pastaruosius penkerius metus nustatyta kita onkologinė liga, diagnozuota jungiamojo audinio liga, nustatyta nestabili sisteminė būklė (pvz., aktyvi infekcija, LOPL paūmėjimas ir kt.), pasireiškusį per mėnesį iki operacijos arba biopsijos, taikytas gydymas antibiotikais arba gliukokortikosteroidais tuo pačiu laikotarpiu, taip pat nėščios ar žindančios moterys bei socialiai pažeidžiami asmenys.

Klinikiniai ir morfologiniai duomenys surinkti iš medicininės dokumentacijos. Pacientai, per gyvenimą surūkę daugiau nei 100 cigarečių, laikyti rūkaliais (dabartiniais arba buvusiais), kitu atveju – nerūkančiais žmonėmis. Rūkymo intensyvumas vertintas pakmečiais: per dieną surūkytų cigarečių pakelių skaičius dauginamas iš rūkymo metų skaičiaus.

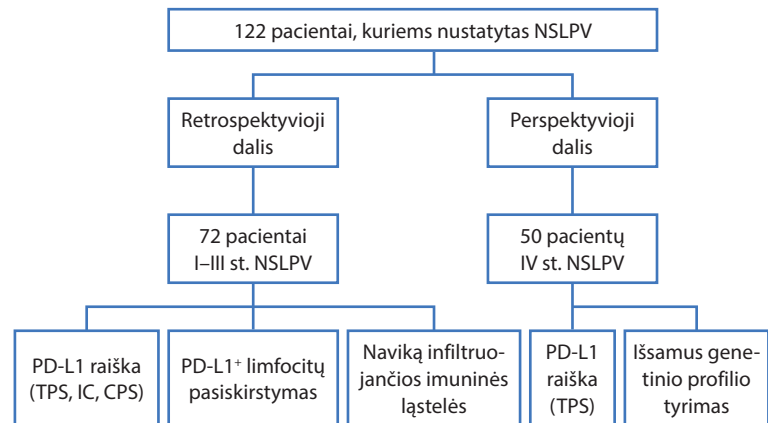
Imunohistocheminis (IHC) dažymas atliktas naudojant formalinę fiksuotą ir parafinę įlietą (FFPE) NSLPV pacientų chirurginę ir biopsinę medžiagą, automatizuotu „Roche Ventana Benchmark XT“ aparatu. PD-L1 dažyti naudotas pelių monokloninis anti-PD-L1 antikūnas („22C3 pharmDx Agilent / Dako“), o vertinimas atliktas šviesiniu mikroskopu („Olympus BX50“) dviejų tyrėjų. Abejotini atvejai peržiūrėti pakartotinai, kol pasiektas bendras sutarimas.

Atliekant PD-L1 raiškos analizę patikrinta dažymo kokybė ir kontroliniai audiniai – placenta bei tonzilė. Analizuotas visas pjūvyje esantis navikinis audinys, išskyrus suirusias ląsteles ir normalų plaučių audinį [22, 23]. Navikinės ląstelės laikytos PD-L1 teigiamosiomis, kai nustatytas bet kokio intensyvumo membranos dažymasis, o imuninės ląstelės – kai dažymasis nustatytas membranoje arba citoplazmoje [24].

Ankstvytosios stadijos NSLPV atveju PD-L1 raiškos vertinimas atliktas naudojant tris vertinimo metodus:

- Naviko proporcijos balą

$$TPS = \frac{\text{PD-L1 teigiamosios navikinės ląstelės}}{\text{visos navikinės ląstelės}} \times 100$$



1 pav. Tyrimo struktūra

PD-L1 – programuotos ląstelių žūties ligandas 1; PD-L1+ limfocitas – PD-L1 teigiamieji limfocitai; NSLPV – nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžys; TPS – naviko proporcijos balas; IC – imuninių ląstelių balas; CPS – sudėtinis proporcijų balas.

- Imuninių ląstelių balą

$$IC = \frac{\text{PD-L1 teigiamosios navikinės ląstelės (limfocitai ir makrofagai)}}{\text{užimamas naviko plotas}}$$

- Sudėtinį proporcijos balą

$$CPS = \frac{\text{PD-L1 teigiamosios navikinės ląstelės} + \text{PD-L1 teigiamosios imuninės ląstelės}}{\text{visos navikinės ląstelės}} \times 100$$

Metastazavusio NSLPV atveju taikytas TPS metodas. Remiantis ankstesniais tyrimais, navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiška (TPS, IC ir CPS) laikyta teigiamą, jei siekė arba viršijo 1 proc. Pagal navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raišką pacientai suskirstyti į tris grupes: taikant TPS – neigiama (iki 1 proc.), maža (1–49 proc.) ir didelė (50 proc. ir daugiau); taikant IC ir CPS – neigiama (iki 1 proc.), maža (1–9 proc.) ir didelė (10 proc. ir daugiau).

Atsižvelgiant į ankstesniuose tyrimuose nustatytas reikšmingas PD-L1 raiškos ir naviko imuninio fenotipo sąsajas, šiame tyrime, įvertinus naviką infiltruojančių imuninių ląstelių pasiskirstymą pagal medianas, išskirti trys naviko imuniniai fenotipai: dykumos – maža imuninių ląstelių infiltracija stromoje ir parenchimoje; atribotasis – maža infiltracija parenchimoje, bet didelė stromoje; uždegiminis – didelė imuninių ląstelių infiltracija parenchimoje.

PD-L1 raiška naviką infiltruojančiuose limfocituose vertinta 10 reprezentatyviausių audinio pjūvio mikroskopinių laukų (HPFs, $\times 400$ didinimas). PD-L1+ limfocitai kiekybiškai įvertinti atskirai naviko parenchimoje ir stromoje, remiantis ankstesniais klinikiniais tyrimais, kurie atskleidė, kad imuninių ląstelių pasiskirstymas skirtingose naviko srityse susijęs su skirtinga pacientų prognoze [10]. Pagal medianą atvejai suskirstyti į mažos ir didelės PD-L1+ limfocitų raiškos grupes.

Disertacijos

CD4⁺ T ląstelių, CD8⁺ T ląstelių, Foxp3⁺CD4⁺ T ląstelių, IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių bei M1 ir M2 makrofagų infiltracija įvertinta ir publikuota ankstesniuose tyrimuose [10, 25, 26].

Naviko genetinis profilis tirtas taikant „FoundationOne CDx“ platformą – kompiuterinę *in vitro* diagnostikos testą, pagrįstą naujos kartos sekoskaitos technologija, kuri leidžia išsamiai nustatyti genetinius pokyčius 324 vėžiui reikšminguose genuose ir TMB. „FoundationOne“ tyrimas atliktas Vokietijoje, naudojant DNR, išskirtą iš nedažytų FFPE NSLPV mėginių, pagal prieinamumo programą. Remiantis ankstesnių klinikinių tyrimų duomenimis, didelis TMB apibrėžtas kaip viršijantis 10 mut./Mb [27].

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant programinę įrangą „IBM SPSS Statistics“ (25 versija).

REZULTATAI

Navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiška (TPS, IC ir CPS) ir PD-L1⁺ limfocitų pasiskirstymas naviko mikroaplinkoje vertinti analizuojant 72 pacientų, sergančių I–III stadijų NSLPV ir gydytų chirurginiu būdu, navikinių audinių.

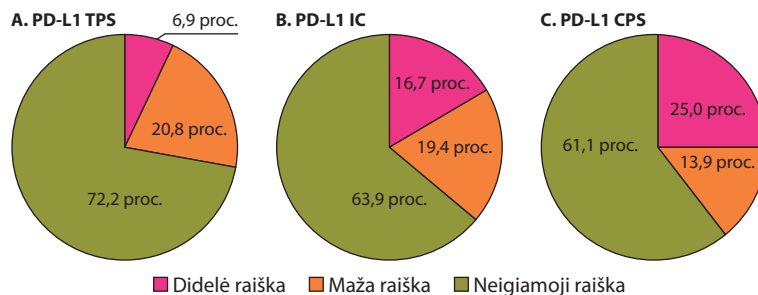
Navikinių ląstelių PD-L1 raiška (TPS) ir genomis profilis tirti 50 IV stadijos NSLPV sergančių pacientų. Pagal standartinę klinikinę protokolą EGFR mutacijos nustatytos PGR metodu, o teigiami atvejai neįtraukti. Dauguma biopsijų (iki dviejų trečdalių) paimtos iš pirminių plaučių navikų, likusios – iš limfmazgių arba tolimųjų metastazių.

Sergant I–III stadijų NSLPV, teigiamoji navikinių ląstelių PD-L1 raiška (TPS) nustatyta 27,8 proc., imuninių ląstelių (IC) – 36,1 proc. (n = 26) ir bendra navikinių ir imuninių (CPS) – 38,9 proc. (n = 28) – atvejų (2 pav.).

Atliekant trijų PD-L1 raiškos vertinimo metodų tarpusavio palyginimą, nustatyti statistškai reikšmingi ryšiai: PD-L1 TPS susijęs su PD-L1 IC (r = 0,585, p = 0,001) bei su PD-L1 CPS (r = 0,759, p = 0,001). Pagal PD-L1 raiškos grupes (neigiamoji ir teigiamoji) atitikimas buvo vidutinis tarp TPS ir IC (κ = 0,556), reikšmingas tarp TPS ir CPS (κ = 0,63) ir labai didelis tarp CPS ir IC (κ = 0,941) vertinimo metodų.

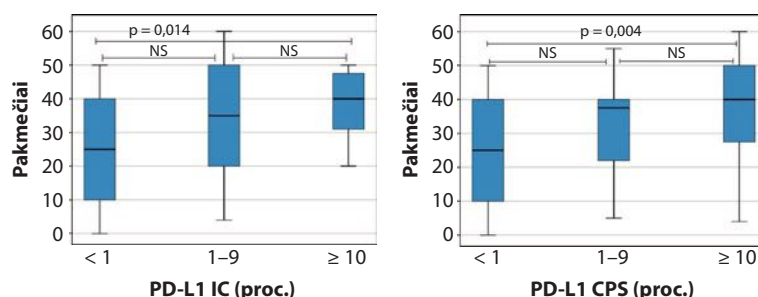
Esant teigiamajai navikinių ląstelių PD-L1 raiškai (TPS), dažniau nustatyta plokščiųjų ląstelių karcinoma nei adenokarcinoma (atitinkamai – 43,3 proc. ir 19,4 proc., p < 0,05). Be to, nustatytas teigiamasis ryšys tarp rūkymo intensyvumo ir imuninių bei bendros navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiškos (IC ir CPS) (3 pav.).

Teigiamoji imuninių ląstelių PD-L1 raiška (IC)



2 pav. PD-L1 raiška I–III stadijų NSLPV: A – PD-L1 TPS; B – PD-L1 IC; C – PD-L1 CPS

PD-L1 – programuotos ląstelių žūties ligandas; TPS – naviko proporcijos balas; IC – imuninių ląstelių balas; CPS – sudėtinis proporcijos balas.



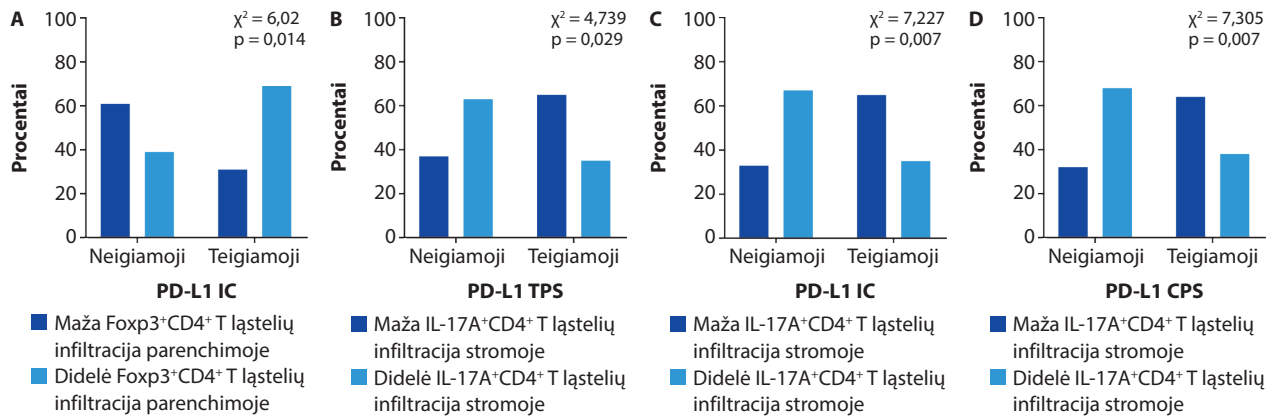
3 pav. Ryšys tarp navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiškos ir rūkymo intensyvumo, išreikšto pakmėčiais, esant ankstyvosios stadijos NSLPV: A – PD-L1 IC ir rūkymo intensyvumas; B – PD-L1 CPS ir rūkymo intensyvumas

PD-L1 – programuotos ląstelių žūties ligandas; IC – imuninių ląstelių balas; CPS – sudėtinis proporcijos balas.

dažniau nustatyta pacientams, kurių naviko audinyje buvo didelė CD4⁺ T ląstelių infiltracija, palyginti su pacientais, kurių navikų infiltracija CD4⁺ T ląstelėmis buvo maža (atitinkamai – 50 proc. ir 23,7 proc., p = 0,02). O teigiamoji bendra navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiška (CPS) dažniau nustatyta pacientams, kurių navikiniame audinyje buvo didelė ne tik CD4⁺, bet ir CD8⁺ T ląstelių infiltracija, palyginti su pacientais, kurių naviko audinio infiltracija CD4⁺ ir CD8⁺ T ląstelėmis buvo maža (atitinkamai – 52,9 proc. ir 26,3 proc., p = 0,021 ir 52,9 proc. ir 26,3 proc., p = 0,048). Navikuose, turinčiuose didelę navikinių ląstelių PD-L1 raišką (TPS), stebėta didesnė M2 makrofagų infiltracija, palyginti su maža navikinių ląstelių PD-L1 raiška (mediana atitinkamai – 168 ir 104, p < 0,05).

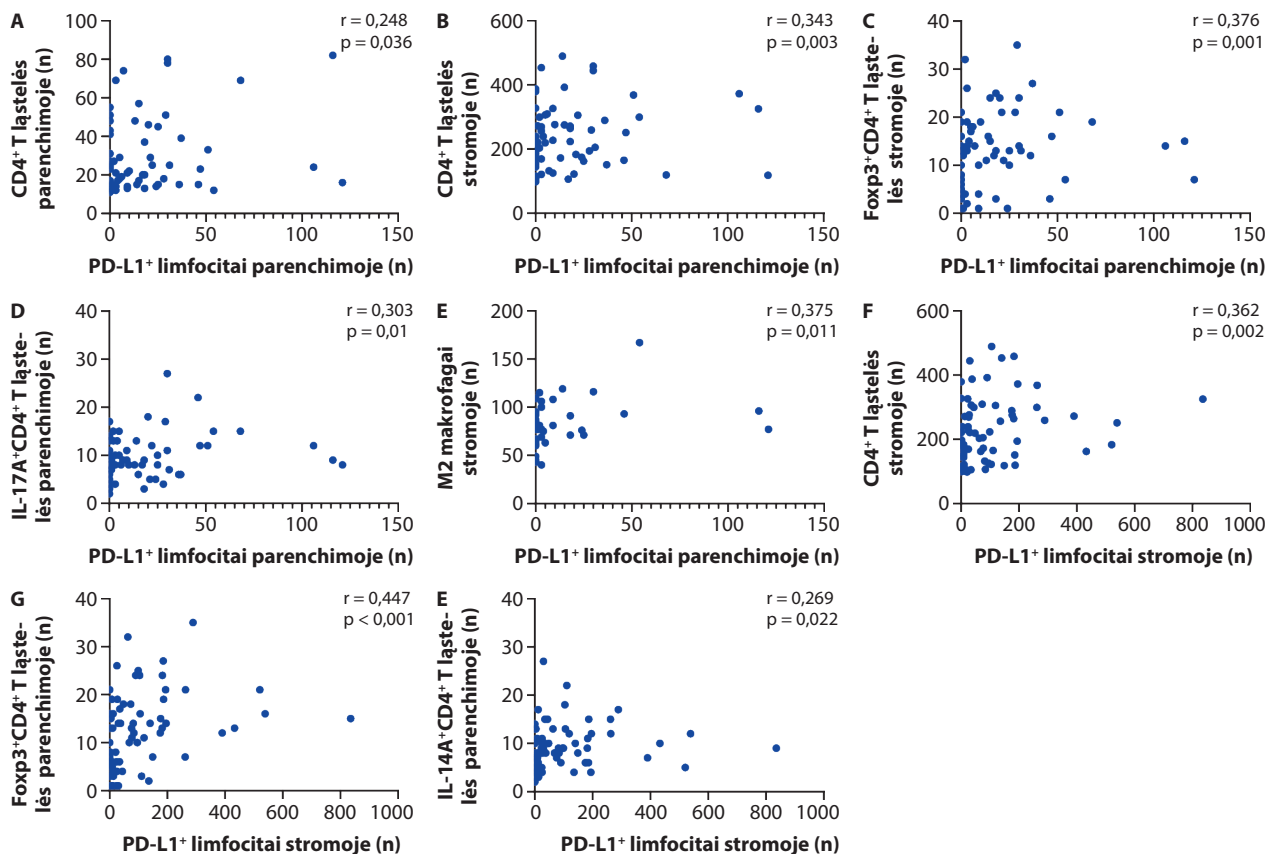
Vertinant PD-L1 raišką TPS, IC ir CPS metodais, neatsižvelgiama į PD-L1 teigiamųjų ląstelių erdvinį pasiskirstymą naviko mikroaplinkoje, todėl papildomai atliktas PD-L1⁺ limfocitų pasiskirstymo naviko parenchimoje ir stromoje vertinimas visiems 72 ankstyvosios NSLPV stadijos pacientams (įskaitant PD-L1 iki 1 proc. atvejus).

Didesnė PD-L1⁺ limfocitų infiltracija stebėta naviko stromoje, palyginti su parenchima (mediana atitinkamai – 36,5 ir 5, p = 0,01). Vyraujanti PD-L1⁺ limfocitų infiltracija naviko parenchimoje dažniau nustatyta vyresnio amžiaus pacientams, palyginti su jaunesniaisiais (mediana atitinkamai – 14 ir 2, p = 0,036). O didesnė



4 pav. Ryšys tarp navikinių bei imuninių ląstelių PD-L1 ir naviką infiltruojančių imuninių ląstelių, atsižvelgiant į jų pasiskirstymą naviko mikroaplinkoje, esant ankstyvosios stadijos NSLPV: A – PD-L1 IC ir Fcpx3⁺CD4⁺ T ląstelių parenchimoje; B – PD-L1 TPS ir IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių stromoje; C – PD-L1 IC ir IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių stromoje; D – PD-L1 CPS ir IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių stromoje

PD-L1 – programuotos ląstelių žūties ligandas 1; TPS – naviko proporcijos balas; IC – imuninių ląstelių balas, CPS – sudėtinis proporcijos balas.

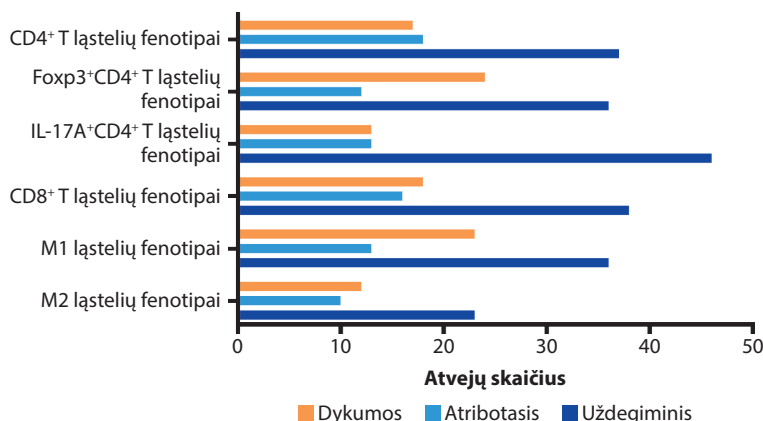


5 pav. Ryšys tarp naviką infiltruojančių PD-L1⁺ limfocitų ir imuninių ląstelių, atsižvelgiant į jų pasiskirstymą naviko mikroaplinkoje, esant ankstyvosios stadijos NSLPV: A – silpnas teigiamasis ryšys tarp PD-L1⁺ limfocitų parenchimoje ir CD4⁺ T ląstelių toje pačioje srityje; B – silpnas teigiamasis ryšys tarp PD-L1⁺ limfocitų parenchimoje ir CD4⁺ T ląstelių stromoje; C – silpnas teigiamasis ryšys tarp PD-L1⁺ limfocitų parenchimoje ir Fcpx3⁺CD4⁺ T ląstelių toje pačioje srityje; D – silpnas teigiamasis ryšys tarp PD-L1⁺ limfocitų parenchimoje ir IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių toje pačioje srityje; E – silpnas teigiamasis ryšys tarp PD-L1⁺ limfocitų parenchimoje ir M2 makrofagų stromoje; F – silpnas teigiamasis ryšys tarp PD-L1⁺ limfocitų stromoje ir CD4⁺ T ląstelių toje pačioje srityje; G – vidutinio stiprumo teigiamasis ryšys tarp PD-L1⁺ limfocitų stromoje ir Fcpx3⁺CD4⁺ T ląstelių parenchimoje; H – silpnas teigiamasis ryšys tarp PD-L1⁺ limfocitų stromoje ir IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių parenchimoje

PD-L1 – programuotos ląstelių žūties ligandas 1; PD-L1⁺ limfocitai – PD-L1 teigiamieji limfocitai.

PD-L1⁺ limfocitų infiltracija stromoje stebėta tarp rūkalių, palyginti su nerūkiančiais (mediana atitinkamai – 44 ir 8, $p = 0,043$). Nustatytas teigiamasis ryšys tarp rūkymo intensyvumo, išreikšto pakmečiais, ir PD-

L1⁺ limfocitų infiltracijos dydžio, nepriklausomai nuo jų pasiskirstymo naviko mikroaplinkoje: parenchimoje ($r = 0,294$; $p = 0,016$), stromoje ($r = 0,284$; $p = 0,021$) ir visame naviko audinyje ($r = 0,276$; $p = 0,025$).



6 pav. Naviko imuniniai fenotipai, atsižvelgiant į naviką infiltruojančių imuninių ląstelių pasiskirstymą, esant ankstyvosios stadijos NSCLP

1 lentelė. Ryšys tarp PD-L1⁺ limfocitų, pasiskirsčiusių naviko audinyje, bei naviko imuninių fenotipų, esant ankstyvosios stadijos NSCLP

Fenotipai		PD-L1 ⁺ limfocitų infiltracija parenchimoje			PD-L1 ⁺ limfocitų infiltracija stromoje		
		Maža	Didelė	p	Maža	Didelė	p
CD8 ⁺ , n (proc.)	Dykumos	9 (50)	9 (50)	0,15	7 (38,9)	11 (61,1)	0,075
	Atribotasis	11 (68,8)	5 (31,3)		12 (75)	4 (25)	
	Uždegiminis	15 (39,5)	23 (60,5)		17 (44,7)	21 (55,3)	
CD4 ⁺ , n (proc.)	Dykumos	11 (64,7)	6 (35,3)	0,147	12 (70,6)	5 (29,4)	0,066
	Atribotasis	10 (55,6)	8 (44,4)		10 (55,6)	8 (44,4)	
	Uždegiminis	14 (37,8)	23 (62,2)		14 (37,8)	23 (62,2)	
Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ , n (proc.)	Dykumos	17 (70,8)	7 (29,2)	0,017	17 (70,8)	7 (29,2)	0,013
	Atribotasis	6 (50)	6 (50)		7 (58,3)	5 (41,7)	
	Uždegiminis	12 (33,3)	24 (66,7)		12 (33,3)	24 (66,7)	
IL-17A ⁺ CD4 ⁺ , n (proc.)	Dykumos	7 (53,8)	6 (46,2)	0,043	6 (45,2)	7 (53,8)	0,022
	Atribotasis	10 (76,9)	3 (23,1)		11 (84,6)	2 (15,4)	
	Uždegiminis	18 (39,1)	28 (60,9)		19 (41,3)	27 (58,7)	

Navikai suskirstyti į tris fenotipus: dykumos, atribotąjį ir uždegiminį, atsižvelgiant į juos infiltruojančių imuninių ląstelių pasiskirstymą naviko mikroaplinkoje.

PD-L1 – programuotos ląstelių žūties ligandas 1; PD-L1⁺ limfocitai – PD-L1 teigiamieji limfocitai.

Navikuose, kuriems nustatyta teigiamoji navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiška (TPS, IC, CPS), stebėta mažesnė IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių infiltracija naviko stromoje, o tik teigiamoji imuninių ląstelių PD-L1 raiška (IC) buvo susijusi su didesne Foxp3⁺CD4⁺ T ląstelių infiltracija naviko parenchimoje (4 pav.).

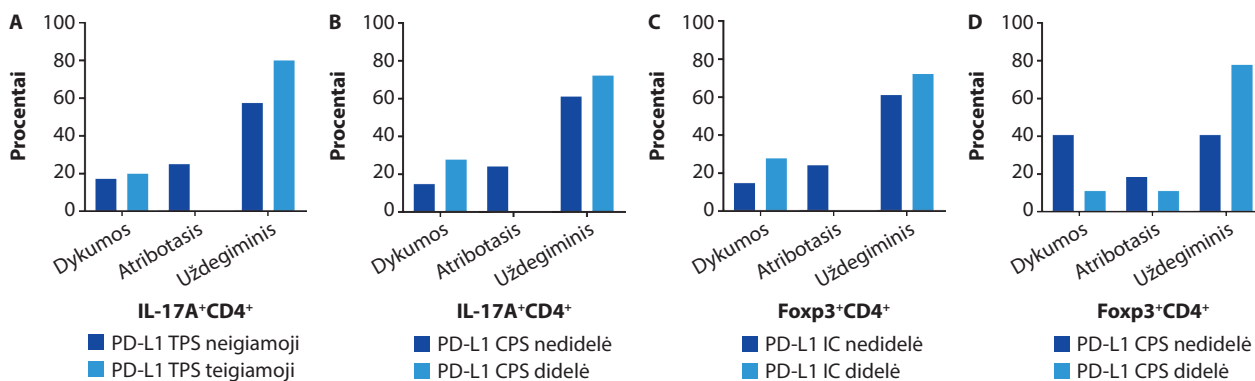
Tolimesnė duomenų analizė patvirtino ryšį tarp PD-L1⁺ limfocitų ir CD4⁺ T ląstelių, įskaitant jų pogrupius (IL-17A⁺CD4⁺ T ląsteles, Foxp3⁺CD4⁺ T ląsteles), ir M2 makrofagų, atsižvelgiant į pasiskirstymą naviko mikroaplinkoje (5 pav. A–H).

Remiantis naviką infiltruojančių imuninių ląstelių pasiskirstymu naviko mikroaplinkoje, navikai suskirstyti į tris imuninius fenotipus: dykumos, atribotąjį ir uždegiminį (6 pav.).

Nustatyti reikšmingi ryšiai tarp navikinių ir imuninių ląstelių, kurioms būdinga PD-L1 raiška, bei imuninių naviko fenotipų, atsižvelgiant į IL-17A⁺CD4⁺ bei Foxp3⁺CD4⁺ T ląstelių pasiskirstymą naviko mikroaplinkoje (7 pav.).

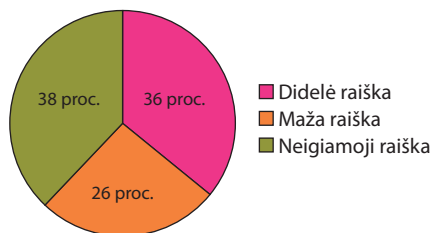
Didžiausia PD-L1⁺ limfocitų infiltracija stebėta uždegiminiame Foxp3⁺CD4⁺ T ląstelių fenotipe, o mažiausia – atribotajame IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių fenotipe (1 lentelė).

Esant metastatazavusiam NSCLP, PD-L1 raiškos vertinimas navikinėse ląstelėse (TPS) atliktas tiriant 50 pacientų navikinių audinių. Teigiamoji PD-L1 raiška nustatyta 62 proc. atvejų (8 pav.). Šių pacientų TMB mediana siekė 7 mut./Mb, o didelis TMB (10 muts./Mb arba daugiau) nustatytas 33,3 proc. atvejų.



7 pav. Naviko imuninių fenotipų dažnis, atsižvelgiant į navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiškos lygį, esant ankstyvosios stadijos NSCLP: A – IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių fenotipai, atsižvelgiant į neigiamą ir teigiamą PD-L1 TPS; B – IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių fenotipai, atsižvelgiant į nedidelę ir didelę PD-L1 CPS; C – Foxp3⁺CD4⁺ T ląstelių fenotipai, atsižvelgiant į nedidelę ir didelę PD-L1 IC; D – Foxp3⁺CD4⁺ T ląstelių fenotipai, atsižvelgiant į nedidelę ir didelę PD-L1 CPS

PD-L1 – programuotos ląstelių žūties ligandas 1; TPS – naviko proporcijos balas; IC – imuninių ląstelių balas; CPS – sudėtinis proporcijos balas.



8 pav. Navikinių ląstelių PD-L1 raiška (TPS), esant metastazavusiam NSCLP

PD-L1 – programuotos ląstelių žūties ligandas 1; TPS – naviko proporcijos balas.

Didesnis TMB nustatytas 65 metų arba vyresniems pacientams, palyginti su jaunesniais (atitinkamai mediana – 9 ir 6, $p = 0,047$), vyrams, palyginti su moterimis (atitinkamai mediana – 9 ir 5, $p = 0,014$), rūkaliams, palyginti su nerūkančiais (atitinkamai mediana – 8 ir 4, $p = 0,018$), bei pacientams, kuriems diagnozuota LOPL, palyginti su tais, kuriems LOPL nenustatyta (atitinkamai mediana – 13,5 ir 6, $p = 0,035$).

Atlikus 50 pacientų, kuriems nustatytas IV stadijos NSCLP, navikinės medžiagos genetinio profiliavimo tyrimą, 111 genų nustatyta 311 genetinių pokyčių. Mutacijos, kurioms esant galimas taikinių terapijos skyrimas, nustatytos trečdaliui atvejų, įskaitant šiuos pokyčius: KRAS G12C (13,7 proc.), ALK (3,9 proc.), BRAF (3,9 proc.), ROS1 (3,9 proc.), EGFR (2 proc.), MET (14 egzome) (2 proc.) ir RET (2 proc.). Visi aktyvinantys genetiniai pokyčiai nustatyti tik adenokarcinomos histologinio tipo NSCLP navikuose. Kiti dažniausiai nustatyti pokyčiai buvo TP53 mutacija, nustatyta daugiau nei pusei visų atvejų (56 proc.), CDKN2A/B geno pokyčiai nustatyti 48 proc., MTAP mutacija – 30 proc., KRAS mutacija (išskyrus G12C) – 20 proc., ir STK11 mutacija – 22 proc. atvejų.

STK11 mutacija dažniau nustatyta navikuose, kuriems būdinga mažesnė navikinių ląstelių PD-L1 raiška (TPS), palyginti su navikais, kuriems būdinga

didesnė PD-L1 raiška (atitinkamai mediana – 0 ir 17,5, $p = 0,019$). TP53 mutacija, priešingai, dažniau nustatyta esant didesnei navikinių ląstelių PD-L1 raiška (TPS), palyginti su mažesne (atitinkamai mediana – 45 ir 0, $p = 0,005$). Be to, navikuose, kuriems būdingas didesnis TMB, dažniau nustatytos tiek STK11 ($p = 0,047$), tiek TP53 mutacijos ($p = 0,008$) (9 pav.).

KRAS/STK11 ir STK11/KEAP1 mutacijų deriniai dažniau nustatyti esant neigiamajai navikinių ląstelių PD-L1 raiškai (TPS), palyginti su teigiamąja (atitinkamai – $p = 0,005$ ir $p = 0,049$).

Vertinant PD-L1 raiškos kaip prognostinio veiksnio reikšmę, visais atvejais iš analizės pašalinti pacientai, kuriems netaikytas gydymas pagal klinikinės indikacijos, bei išplitusio NSCLP atveju – gydyti taikinių terapija. I–III stadijų NSCLP atveju į analizę įtraukti 55 pacientai (vidutinė stebėsenos trukmė – 108 mėn.), o IV stadijos NSCLP atveju – 36 pacientai (vidutinė stebėsenos trukmė – 17 mėn.).

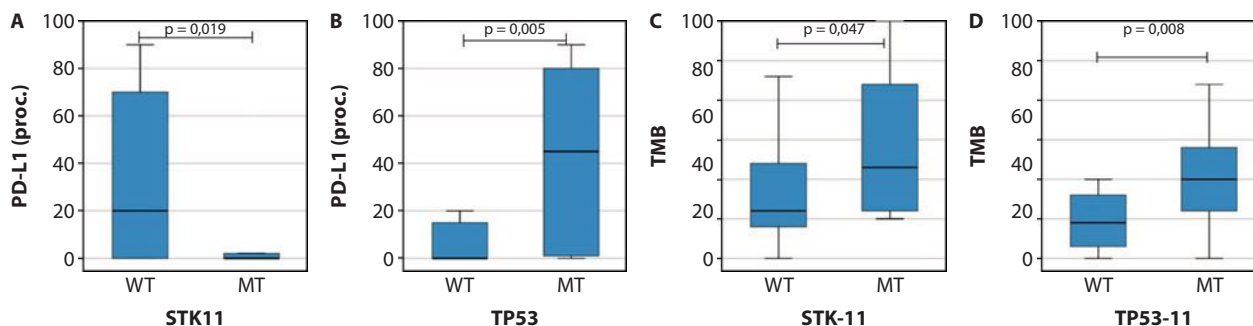
Pastebėta tendencija, kad teigiamoji imuninių ląstelių PD-L1 raiška (IC) ir bendra navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiška (CPS) yra susijusi su ilgesniu išgyvenamumu, be ligos atsinaujinimo, palyginti su atvejais, kai PD-L1 raiška, vertinta minėtais metodais, buvo neigiamoji (2 lentelė).

Vertinant radiologinį atsaką metastazavusio NSCLP atveju, dalinis atsakas nustatytas 27,8 proc., stabili

2 lentelė. Navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiškos ryšys su išgyvenamumu be ligos ir bendruoju išgyvenamumu, esant ankstyvosios stadijos NSCLP

		Išgyvenamumo be ligos mediana (mėn.)	p	Bendrojo išgyvenamumo mediana (mėn.)	p
PD-L1 TPS	neigiamoji	116	0,106	55	0,209
	teigiamoji	NR		NR	
PD-L1 IC	neigiamoji	115	0,073	37	0,641
	teigiamoji	NR		NR	
PD-L1 CPS	neigiamoji	55	0,056	36	0,333
	teigiamoji	NR		NR	

PD-L1 – programuotos ląstelių žūties ligandas 1; TPS – naviko proporcijos balas; IC – imuninių ląstelių balas; CPS – sudėtinis proporcijos balas.



9 pav. Ryšiai tarp PD-L1 TPS, TMB ir genetinių pokyčių, esant metastazavusiam NSCLP: A – PD-L1 TPS ir STK11; B – PD-L1 TPS ir TP53; C – TMB ir STK11; D – TMB ir TP53

PD-L1 – programuotos ląstelių žūties ligandas 1; TPS – naviko proporcijos balas, TMB – naviko proporcijos balas.

Disertacijos

liga – 47,2 proc., o progresuojanti – 25 proc. pacientų. Nustačius KEAP1 mutaciją ligos progresavimo tikimybė buvo 13 kartų didesnė nei navikuose su nemutavusiu KEAP1 genu (santykinė rizika (SR) – 13; 95 proc. pasikliautinis intervalas (PI) – 1,143–147,819; $p = 0,041$). Taip pat stebėta dažnesnė dalinio atsako tendencija navikams su teigiamąja navikinių ląstelių PD-L1 raiška (TPS), palyginti su tais, kurių PD-L1 raiška buvo neigiamoji (atitinkamai – 41 proc. ir 7 proc., $p = 0,082$).

Greitas ligos progresavimas per 3 mėn. nuo gydymo pradžios, buvo nustatytas 22 proc. pacientų, kuriems skirtas metastazavusio NSLPV gydymas imunoterapija arba chemoimunoterapija. KEAP1 mutacija buvo susijusi su 16 kartų didesne greito ligos progresavimo tikimybe ($p = 0,028$), o esant ERBB2 pokyčiams stebėta panaši tendencija ($p = 0,067$).

IŠVADOS

1. Ankstyvosios stadijos NSLPV sergantiems pacientams, kuriems taikytas chirurginis gydymas, teigiamoji navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiška (≥ 1 proc.), kai vertinimas atliktas TPS, IC ir CPS metodais, nustatyta atitinkamai 28 proc., 36 proc. ir 39 proc., o didelė PD-L1 raiška (TPS ≥ 50 proc., IC ≥ 10 proc., CPS ≥ 10 proc.) – atitinkamai 7 proc., 17 proc. ir 25 proc. Tarp visų trijų vertinimo metodų nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys. Nustatytas teigiamasis ryšys tarp navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiškos (TPS, IC ir CPS) ir rūkymo intensyvumo. Nustatyta teigiamoji (≥ 1 proc.) arba didelė (≥ 10 proc.) imuninių ląstelių PD-L1 raiška (IC) arba bendra navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiška (CPS) buvo susijusi su didesne CD8⁺ T ląstelių, CD4⁺ T ląstelių ir Foxp3⁺CD4⁺ T ląstelių infiltracija, o didelė navikinių ląstelių PD-L1 raiška (TPS ≥ 50 proc.) – su didesne M2 makrofagų infiltracija naviko mikroaplinkoje.
2. Ankstyvosios stadijos NSLPV sergančių pacientų, kuriems taikytas chirurginis gydymas, limfocitai, turintys PD-L1 raišką (PD-L1⁺ limfocitai), vyravo naviko stromoje, palyginti su parenchima. Nustatyti ryšiai tarp PD-L1 raiškos ir klinikinių paciento bei morfologinių naviko požymių:
 - Teigiamoji navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiška (TPS, IC ≥ 1 proc.) buvo susijusi su mažesne IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių infiltracija naviko stromoje. Tik teigiamoji imuninių ląstelių PD-L1 raiška (IC) buvo susijusi su didesne Foxp3⁺CD4⁺ T ląstelių infiltracija naviko salelėse.
 - Didesnis PD-L1⁺ limfocitų kiekis naviko parenchimoje dažniau nustatytas vyresniems

žmonėms (≥ 65 metų), o stromoje – rūkaliams. Didesnė PD-L1⁺ limfocitų infiltracija buvo susijusi su didesne CD4⁺ T ląstelių, Foxp3⁺CD4⁺ T ląstelių, IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių, M2 makrofagų infiltracija ir mažesne M1 makrofagų infiltracija.

Suskirsčius navikus į tris imuninius fenotipus, atsižvelgiant į imuninių ląstelių pasiskirstymą naviko mikroaplinkoje uždegiminis fenotipas nustatytas dažniausiai ir sudarė apie pusę visų atvejų, o atribotasis ir dykumos fenotipai buvo retesni. Imuninių ląstelių PD-L1 raiška (IC) ir bendra navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiška (CPS) buvo reikšmingai susijusi su imuniniais fenotipais, atsižvelgiant į Foxp3⁺CD4⁺ T ląstelių ir IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių pasiskirstymą naviko mikroaplinkoje. Didelė PD-L1⁺ limfocitų infiltracija dažniau nustatyta uždegiminiam fenotipui (pagal Foxp3⁺CD4⁺ T ląsteles), o maža – atribotajam fenotipui (pagal IL-17A⁺CD4⁺ T ląsteles), palyginti su kitais fenotipais.

3. Teigiamoji navikinių ląstelių PD-L1 raiška (TPS ≥ 1 proc.) nustatyta 62 proc. metastazavusiu NSLPV sergantiems pacientams, o didelė raiška (TPS ≥ 50 proc.) – 36 proc. atvejų. Mutacijos, kurioms esant galima skirti taikinių terapiją, nustatytos 33 proc. atvejų: KRAS G12C (13,7 proc.), ALK (3,9 proc.), BRAF (3,9 proc.), ROS1 (3,9 proc.), EGFR (2 proc.), MET (14 egzone) (2 proc.) ir RET (2 proc.) pokyčiai. Vertinant kitas mutacijas, dažniausiai nustatytos TP53 (56 proc.), CDKN2A/B (48 proc.), MTAP (30 proc.), STK11 (22 proc.) ir KRAS (kitos nei G12C) (20 proc.). Didelis TMB (≥ 10 muts./Mb) buvo 37 proc. pacientų.
4. Metastazavusiu NSLPV sergantiems pacientams didesnis TMB buvo nustatomas vyresnio amžiaus pacientams, vyrams, rūkaliams bei pacientams, kuriems diagnozuota LOPL. Nustatytas teigiamasis ryšys tarp TMB ir rūkymo intensyvumo. TP53 mutacija buvo dažniau nustatoma navikuose, turinčiuose didesnę navikinių ląstelių PD-L1 raišką (TPS) ir didesnę TMB, o STK11 – navikuose, turinčiuose mažesnę navikinių ląstelių PD-L1 raišką (TPS), bet didesnę TMB. Pacientams, kurių navikams nenustatyta navikinių ląstelių PD-L1 raiška (TPS), dažniau nustatyti KRAS / STK11 ir STK11 / KEAP1 mutacijų deriniai.
5. Pacientams, sergantiems ankstyvosios stadijos nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžiu, pastebėta tendencija – esant teigiamajai imuninių ląstelių PD-L1 raiškai (IC ≥ 1 proc.) ir bendrai navikinių ir imuninių ląstelių PD-L1 raiškai (CPS ≥ 1 proc.),

išgyvenamumas, be ligos atsinaujinimo, buvo ilgesnis.

Metastazavusio NSLPV atveju liga progresavo dažniau, jei naviko audinyje nustatyta KEAP1 mutacija.

Greitas ligos progresavimas stebėtas 22,2 proc. metastazavusio NSLPV atvejų, neatsižvelgiant į tai, ar gydyti taikyta tik imunoterapija, ar imunoterapija kartu su chemoterapija. Tarp pacientų, kuriems nustatytas greitas ligos progresavimas, dažniausios nustatytos mutacijos – TP53 (87,5 proc.), STK11 (37,5 proc.) ir KEAP1 (37,5 proc.); KEAP1 mutacija išliko reikšmingai susijusi su blogesne prognoze; panaši greito ligos progresavimo tendencija nustatyta ir esant ERBB2 pokyčiams.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Nustatytas suderinamumas tarp trijų PD-L1 raiškos vertinimo metodų (TPS, IC ir CPS) ir statistiškai reikšmingas ryšys tarp navikinių bei imuninių ląstelių PD-L1 raiškos ir naviką infiltruojančių imuninių ląstelių. Atsižvelgiant į šį suderinamumą, PD-L1 raiška vertinama ne tik naviko ląstelėse, bet ir imuninėse ląstelėse (limfocituose ir makrofaguose) pagal imuninių ląstelių balą (IC) arba sudėtinę proporcijos balą (CPS), galėtų būti toliau tiriama siekiant įvertinti prognostinę ir predikcinę PD-L1 raiškos vertę, sprendžiant dėl imunoterapijos skyrimo NSLPV sergantiems pacientams.
2. Nustatytas reikšmingas ryšys tarp navikinių bei imuninių ląstelių turinčių teigiamą PD-L1 raišką ir naviką infiltruojančių CD4⁺ T ląstelių, Foxp3⁺CD4⁺ T ląstelių, CD8⁺ T ląstelių bei M2 makrofagų, taip pat tarp limfocitų, turinčių teigiamą PD-L1 raišką (PD-L1⁺ limfocitų) naviko parenchimoje bei stromoje, ir naviką infiltruojančių Foxp3⁺CD4⁺ T ląstelių, IL-17A⁺CD4⁺ T ląstelių, M1 ir M2 makrofagų, pasiskirsčiusių naviko audinyje, patvirtina naviką infiltruojančių imuninių ląstelių svarbą PD-1 / PD-L1 veikimo mechanizmui ir pabrėžia tolesnių tyrimų svarbą.
3. Ryšys tarp TMB ir pacientų, sergančių metastazavusiu NSLPV, išgyvenamumo nenustatytas. Šis žymuo laikomas nepatikimu metastazavusiu NSLPV sergančių žmonių prognozei vertinti ir nerekomenduojamas naudoti klinikinėje praktikoje.
4. Nustatyti tam tikri genominiai profiliai galėtų veikti kaip papildomi prognostiniai žymenys, padedantys identifikuoti pacientus, kuriems būdingas greitas ligos progresavimas. Tokiais atvejais gali būti tikslinga taikyti intensyvesnę stebėsenos planą arba agresyvesnes gydymo strategijas, pvz.,

chemoimunoterapiją vietoje vien imunoterapijos.

5. Reikšmingai dažniau liga progresavo pacientams, kurių navikuose nustatyta KEAP1 mutacija, todėl KEAP1 mutacija gali būti laikoma papildomu prognostiniu žymeniu, padedančiu prognozuoti gydymo atsaką NSLPV sergantiems pacientams, kai taikomas imunoterapinis gydymas (vienas arba kartu su chemoterapija).

STRAIPSNAI, KURIUOSE PASKELBTI DISERTACIJOS REZULTATAI

1. Gurevičienė G, Matulionė J, Poškienė L, Miliauskas S, Žemaitis M. PD-L1 Expression and tumour microenvironment patterns in resected non-small-cell lung cancer. *Medicina*. 2024; 60(3):482.
2. Gurevičienė G, Matulionė J, Poškienė L, Miliauskas S, Žemaitis M. PD-L1+ Lymphocytes are associated with CD4⁺, Foxp3⁺CD4⁺, IL17⁺CD4⁺ T cells and subtypes of macrophages in resected early-stage non-small cell lung cancer. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(19):10827.
3. Gurevičienė G, Poškienė L, Miliauskas S, Žemaitis M. PD-L1 expression and comprehensive genomic profiling in advanced NSCLC: a single-centre experience. *Int J Mol Sci*. 2025; 26(13):6348.

LITERATŪRA

1. Smolarz B, Łukasiewicz H, Samulak D, Piekarska E, Kołaciński R, Romanowicz H. Lung cancer—epidemiology, pathogenesis, treatment and molecular aspect (review of literature). *Int J Mol Sci*. 2025; 26(5):2049.
2. Spigel D, De Marinis F, Giaccone G, Reinmuth N, Vergnenegre A, Barrios CH, et al. IMpower110: Interim overall survival (OS) analysis of a phase III study of atezolizumab (atezo) vs platinum-based chemotherapy (chemo) as first-line (1L) treatment (tx) in PD-L1–selected NSCLC. *Ann Oncol*. 2019; 30:v915.
3. O'Brien M, Paz-Ares L, Marreaud S, Dafni U, Oselin K, Havel L, et al. Pembrolizumab versus placebo as adjuvant therapy for completely resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (PEARLS/KEYNOTE-091): an interim analysis of a randomised, triple-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2022; 23(10):1274–86.
4. Wu J, Lin Z. Non-small cell lung cancer targeted therapy: drugs and mechanisms of drug resistance. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(23):15056.
5. Kanwal B, Biswas S, Seminara RS, Jeet C. Immunotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients: ushering chemotherapy through the checkpoint inhibitors? *Cureus*. 2018; 10(9):e3254.
6. Dang TO, Ogunniyi A, Barbee MS, Drilon A. Pembrolizumab for the treatment of PD-L1 positive advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2016; 16(1):13–20.
7. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2018; 378(22):2078–92.
8. Felip E, Altorki N, Zhou C, Vallières E, Martínez-Martí A, Rittmeyer A, et al. Overall survival with adjuvant atezolizumab after chemotherapy in resected stage II–IIIA non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase III trial. *Ann Oncol*. 2023; 34(10):907–19.
9. Saw SP, Ang MK, Tan DS. Adjuvant immunotherapy in patients with early-stage non-small cell lung cancer and future directions. *Curr Treat Options in Oncol*. 2022; 23(12):1721–31.
10. Jackutė J, Žemaitis M, Pranys D, Šitkauskienė B, Miliauskas S, Bajoriūnas V, et al. Distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in tumor islets and stroma from patients with non-small cell lung cancer in association with COPD and smoking. *Medicina*. 2015; 51(5):263–71.

11. Biton J, Mansuet-Lupo A, Pécuchet N, Alifano M, Ouakrim H, Arrondeau J, et al. *TP53, STK11*, and *EGFR* mutations predict tumor immune profile and the response to anti-PD-1 in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2018; 24(22):5710–23.
12. De Giglio A, De Biase D, Favorito V, Maloberti T, Di Federico A, Zacchini F, et al. *STK11* mutations correlate with poor prognosis for advanced NSCLC treated with first-line immunotherapy or chemo-immunotherapy according to *KRAS*, *TP53*, *KEAP1*, and *SMARCA4* status. *Lung Cancer.* 2025; 199:108058.
13. Catalano M, Iannone LF, Nesi G, Nobili S, Mini E, Roviello G. Immunotherapy-related biomarkers: Confirmations and uncertainties. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2023; 192:104135.
14. Di Federico A, De Giglio A, Gelsomino F, Sperandi F, Melotti B, Ardizzoni A. Predictors of survival to immunotherapy and chemoimmunotherapy in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2023; 115(1):29–42.
15. Wallen ZD, Nesline MK, Tierno M, Roos A, Schnettler E, Husain H, et al. Genomic profiling of NSCLC tumors with the TruSight oncology 500 assay provides broad coverage of clinically actionable genomic alterations and detection of known and novel associations between genomic alterations, TMB, and PD-L1. *Front Oncol.* 2024; 14:1473327.
16. Ferrara R, Mezquita L, Texier M, Lahmar J, Audigier-Valette C, Tessonier L, et al. Comparison of fast-progression, hyperprogressive disease, and early deaths in advanced non-small-cell lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors or chemotherapy. *JCO Precis Oncol.* 2020; (4):829–40.
17. Provencio M, Nadal E, Insa A, García-Campelo MR, Casal-Rubio J, Dómine M, et al. Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2020; 21(11):1413–22.
18. Rojas F, Parra ER, Wistuba II, Haymaker C, Solis Soto LM. Pathological response and immune biomarker assessment in non-small-cell lung carcinoma receiving neoadjuvant immune checkpoint inhibitors. *Cancers.* 2022; 14(11):2775.
19. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017; 377(20):1919–29.
20. Long Y, Yu X, Chen R, Tong Y, Gong L. Noncanonical PD-1/PD-L1 axis in relation to the efficacy of anti-PD therapy. *Front Immunol.* 2022; 13:910704.
21. Gandara D, Reck M, Moro-Sibilot D, Mazieres J, Gadgeel S, Morris S, et al. Fast progression in non-small cell lung cancer: results from the randomized phase III OAK study evaluating second-line atezolizumab versus docetaxel. *J Immunother Cancer.* 2021; 9(3):e001882.
22. Marletta S, Fusco N, Munari E, Luchini C, Cimdamore A, Brunelli M, et al. Atlas of PD-L1 for pathologists: indications, scores, diagnostic platforms and reporting systems. *JPM.* 2022; 12(7):1073.
23. Tsao MS, Kerr KM, Dacic S, Yatabe Y, Hirsch FR. The IASLC atlas of PD-L1 testing in lung cancer [Internet]. 2017.
24. Lantuejoul S, Sound-Tsao M, Cooper WA, Girard N, Hirsch FR, Roden AC, et al. PD-L1 Testing for lung cancer in 2019: perspective from the IASLC pathology committee. *J Thorac Oncol.* 2020; 15(4):499–519.
25. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskienė B, Miliauskas S, Bajoriunas V, et al. The prognostic influence of tumor infiltrating Foxp3+CD4+, CD4+ and CD8+ T cells in resected non-small cell lung cancer. *J Inflamm.* 2015; 12(1):63.
26. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskienė B, Miliauskas S, Bajoriunas V, et al. The prognostic influence of tumor infiltrating Foxp3+CD4+, CD4+ and CD8+ T cells in resected non-small cell lung cancer. *J Inflamm.* 2015; 12(1):63.
27. Marcus L, Fashoyin-Aje LA, Donoghue M, Yuan M, Rodriguez L, Gallagher PS, et al. FDA Approval summary: pembrolizumab for the treatment of tumor mutational burden-high solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2021; 27(17):4685–9.