



EVALUACIJA ZNAČAJA ROS1 EKSPRESIJE KOD PACIJENATA OBOLJELIH OD NSCLC TRETIRANIH IMUNOTERAPIJOM

EVALUATION OF THE SIGNIFICANCE OF ROS1 EXPRESSION IN NSCLC PATIENTS TREATED WITH IMMUNOTHERAPY

Ljiljana Tadić Latinović*, Srđan Mitrović*†, Mirko Stanetić*‡, Slavica Marić*††, Velibor Simetić*††, Milica Srećić Tomić†, Božana Babić*†

SAŽETAK Uvod: Iako su inhibitori imunoloških kontrolnih tačaka (ICIs) značajno unaprijedili preživljavanje pacijenata sa karcinomom pluća i visokom ekspresijom PD-L1 (TPS $\geq$ 50%), terapijski odgovor u ovoj grupi ostaje heterogen. Cilj ove studije bio je istražiti kako niska i umjerena ekspresija ROS1 proteina utiče na ukupno preživljavanje pacijenata koji primaju imunoterapiju kao primarni modalitet liječenja. **Metode:** Studija je dizajnirana kao retrospektivna, opservacijska analiza koja je obuhvatila 18 pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća (NSCLC) stadijuma III i IV, liječenih u Univerzitetском kliničkom centru Republike Srpske. Pacijenti su podijeljeni u dvije grupe. Prvu grupu (n=9) čine pacijenti sa imunohistohemijski (IHH) dokazanom niskom (1+) ili umjerenom (2+) ekspresijom ROS1 proteina (klon SP384). Kontrolnu grupu (n=9) čine pacijenti koji su bili ROS1 negativni. Zajednički kriterijum za obje grupe bila je visoka ekspresija PD-L1 (TPS $\geq$ 50%). Statistička analiza preživljavanja izvršena je Kaplan-Meierovom metodom uz primjenu Log-Rank testa. **Rezultati:** Analiza preživljavanja pokazala je statistički značajnu razliku između grupa ($\chi^2 = 5.407$; df= 1; p = 0,020). Uprkos visokom PD-L1 statusu, pacijenti sa ROS1 pozitivnim tumorima ostvarili su značajno kraće ukupno preživljavanje u odnosu na kontrolnu grupu. **Zaključak:** Imunohistohemijska detekcija ROS1 proteina, čak i pri niskom intenzitetu bojenja, predstavlja značajan negativni prediktivni faktor za uspjeh imunoterapije kod pacijenata sa NSCLC. Ovi nalazi ukazuju na to da bi pacijenti sa bilo kojim stepenom ROS1 ekspresije mogli imati veću korist od rane primjene ciljane terapije inhibitorima tirozin-kinaze (TKI) u odnosu na standardnu imunoterapiju. **KLjučne riječi:** NSCLC, ROS1, PD-L1, imunoterapija, ukupno preživljavanje.

UVOD

U svijetu je u 2022. godini registrovano 2 480 675 pacijenata sa karcinomom pluća (12,4 % od svih maligniteta) sa 1 817 469 umrlih (18,7 % od svih maligniteta) što ga stavlja na prvo mjesto i po incidenci i po mortalitetu među malignitetima (1). Većina slučajeva karcinoma pluća je dijagnostikovana kada već postoje metastaze (2).

Dobro je poznato da stečene genske promjene u određenim pokretačkim genima (eng. *driver genes*) rezultiraju rastom tumora i

invazivnošću, te da pacijenti koji nose određene mutacije mogu imati koristi od ciljanih terapija (3).

Jedna od potencijalnih pokretačkih mutacija je i ROS1 mutacija (3). ROS1 je prvobitno identifikovan kao homolog transformišuće sekvence ptičjeg sarkoma RNA virusa UR2(4). ROS1 predstavlja receptorsku tirozin-kinazu iz porodice inzulinskih receptora koja djeluje kao onkogen pokretač kod 1–2% pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća (eng. *non-small-cell lung cancer - NSCLC*), i to putem genske translokacije između ROS1 i drugih gena, od



kjih je najčešći CD74(5).ROS1 fuzija može dovesti do konstitutivne aktivacije kinaze, što rezultira povećanom proliferacijom, preživljavanjem i migracijom ćelija zbog pojačane regulacije JAK/STAT, PI3K/AKT i MAPK/ERK signalnih puteva(6). Histološke i kliničke karakteristike koje su povezane sa ROS1 translokacijama uključuju histologiju adenokarcinoma, ženski pol, mlađu životnu dob, osobe koje nikada nisu pušile i pacijente azijskog porijekla (7), profil sličan ALK pozitivnim tumorima pluća (5).

U većini laboratorija, ROS1 fuzije se prvobitno ispituju imunohistohemijom (IHH), a nejasni i pozitivni slučajevi se zatim potvrđuju fluorescentnom *in situ* hibridizacijom (FISH) ili molekularnom analizom, uključujući sekvenciranje sljedeće generacije (eng. *next generation sequencing* - NGS) (4).

Mnoge od ovih pokretačkih genetičkih promjena trenutno se mogu gađati specifičnom terapijom, kao što su inhibitori tirozin-kinaze (eng. *tyrosine kinase inhibitors, TKI*), koji su značajno poboljšali prognozu NSCLC (8). Pacijenti kod kojih se ne potvrdi prisustvo pokretačkih mutacija, jedan od modaliteta liječenja je primjena imunološke terapije (9).

Među mnogim putevima imunoloških kontrolnih tačaka, najistaknutiji u liječenju karcinoma pluća je PD-1 (eng. *Programmed celldeath, PD-1*) receptorski signalni put (10). Interakcija između PD-1 receptora eksprimiranog na limfocitima i njegovog liganda PD-L1 (eng. *Programmedcelldeath-ligand, PD-L1*) indukuje inhibiciju T-limfocita tokom hronične izloženosti antigenu, čime se onemogućava efikasan antitumorski imunski odgovor posredovan T-ćelijama (11).

Uprkos niskom petogodišnjem preživljavanju terapijski protokoli su se značajno promijenili nakon uvođenja lijekova iz grupe inhibitora kontrolnih tačaka – ICIs (eng. *Immune checkpoint inhibitors*)(12,11). Nekoliko predstavnika ICIs koji djeluju na

PD-1 danas je odobreno od strane FDA (*US Foodand Drug Administration*) i EMA (*EuropeanMedicinesAgency*): pembrolizumab, atezolizumab, nivolumab, cemiplimab (13). Rezultati nekoliko velikih kliničkih studija su pokazali benefite primjene ICIs-a preživljavanje – OS (eng. *overallsurvival*) i preživljavanje bez progresije bolesti – PFS (eng. *progression-freesurvival*) (10).

Imunterapija je odobrena od strane FDA i EMA kao terapija prvog izbora u liječenju pacijenata sa metastatskim NSCLC čiji tumor pokazuje PD-L1 ekspresiju u $\geq 50\%$ tumorskih ćelija (takozvani TPS – *tumor proportionscore*) ili kod pacijenata sa lokalno uznapredovalim i/ili metastatskim NSCLC koji su prethodno liječeni hemoterapijom i imaju TPS $\geq 1\%$ (12).

Jedan od trenutno najvećih problema koje ima upotreba ICIs je nedostatak znanja koji pacijenti će dobro odgovoriti na tretman. Najbolji danas poznati biomarker je imunohistohemijsko određivanje PD-L1(13).

Prema NCCN smjernicama preporučeno je da se uz PD-L1 izvrši testiranje i na ROS1 (14). Pacijenti koji imaju visoku ekspresiju na IHH uglavnom se potvrdi prisustvo ROS1 mutacije i ti pacijenti se liječe ciljanom terapijom. Umjerena i slaba ekspresija obično nije vezana za prisustvo mutacije na ROS1 genu, ali vrlo često ukazuje na prisustvo nekih drugih pokretačkih mutacija(15).

Postoji jako mali broj studija koji obuhvataju analizu preživljavanja pacijenata sa niskom i umjerenom ekspresijom ROS1 i visokom ekspresijom PD-L1 kod kojih nije rađenakompletna genetička dijagnostika na prisustvo pokretačkih mutacija prema preporučenim NCCN smjernicama koje uključuju EGFR, ALK, ROS1, BRAF, KRAS, RET, MET, HER-2, NTRK(14).



METODE

Dizajn studije

Studija je dizajnirana kao retrospektivna, aplikativna, opservacijska studija.

Istraživanje je obuhvatilo 18 pacijenata oboljelih od adenokarcinoma ili NSCLC čiji su uzorci uzorkovani i analizirani u Zavodu za kliničku patologiju Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske (UKC RS). Period istraživanja obuhvata pacijente kojima je urađena biopsija u periodu od januara 2021. do decembra 2024. godine, a pacijenti su podijeljeni u ispitivanu i kontrolnu grupu.

Uključni kriterijumi za ispitivanu grupu su bili: 1) pacijenti oba pola sa dijagnostikovanim NSCLC koji su stariji od 18 godina; 2) pacijenti kojima je dijagnostikovan adenokarcinom primarnog porijekla pluća koji je TTF1 ili napsin A pozitivan. Kod jednog pacijenta je postavljena dijagnoza NSCLC. Za jednog pacijenta koji je bio TTF1 negativan i p40 negativan, a dokazana je CK7 pozitivnost - drugim imidžing tehnikama isključeno je postojanje primarnog tumora na drugim lokalizacijama 3) pacijenti kojima je imunohistohemijom dokazana niska (1+) i umjerena (2+) ekspresija ROS1; 4) pacijenti kojima je dokazana visoka ekspresija PD-L1 ($\geq 50\%$); 5) pacijenti sa lokalno uznapredovalim ili metastatskim NSCLC (stadijumi IIIB, IIIC, IVA i IVB); 6) koji su liječeni sa ICIs; 7) pacijenti o kojima su postojali podaci o preživljavanju zaključno sa martom 2026. godine.

Uključni kriterijumi za kontrolnu grupu su bili: 1) pacijenti oba pola sa dijagnostikovanim NSCLC koji su stariji od 18 godina; 2) pacijenti kojima je dijagnostikovan adenokarcinom primarnog porijekla pluća koji je TTF1 ili napsin A pozitivan ili je drugim imidžing tehnikama isključeno postojanje primarnog adenokarcinoma na drugim lokalizacijama; 3) pacijenti koji su imunohistohemijski bili ROS1 negativni (0); 4) pacijenti kojima je dokazana

visoka ekspresija PD-L1 ($\geq 50\%$); 5) pacijenti sa lokalno uznapredovalim ili metastatskim NSCLC (stadijumi IIIB, IIIC, IVA i IVB); 6) koji su liječeni sa ICIs; 7) pacijenti o kojima su postojali podaci o preživljavanju zaključno sa martom 2026. godine.

Isključni kriterijumi su bili: 1) pacijenti mlađi od 18 godina; 2) pacijenti sa dijagnostikovanim sitnoćelijskim karcinomom pluća (eng. *SCLC* – *smallcelllungcancer*); 3) pacijenti sa NSCLC kojima je u UKC RS rađena IHH na PD-L1 sa TPS $< 50\%$ ili ROS1 0; 4) pacijenti koji su imali druge histološke tipove NSCLC osim adenokarcinoma; 5) pacijenti u nižim stadijumima bolesti; 5) pacijenti o kojima nije bilo podataka o preživljavanju.

Metodologija

Analizom su obuhvaćeni podaci pacijenata dobijeni iz medicinske dokumentacije (medicinska istorija bolesti, odluke onkološkog konzilijuma, nalazi patohistološke analize te laboratorijske analize).

U Zavod za kliničku patologiju UKC RS dostavljeni uzorci tkiva su uzorkovani u UKC RS i imunohistohemijski testirani sa ciljem da se odredi histološki tip tumora, TPS ekspresija PD-L1 i H-score za ROS1 ekspresiju. Uzorci su u Zavod za kliničku patologiju dostavljeni fiksirani u puferizovanom rastvoru 10% formalina, a vrsta analiziranih uzoraka je dobijena biopsijom bronha, transtorakalnom biopsijom, biopsijom pleure, ekscizijom limfnog čvora, ispitivanjem metastatskih uzoraka tkiva (mozak) ili citološkim blokom pleuralnog punktata.

Uzorci su fiksirani u 10% formalinu, ubačeni su u parafinske blokove, iz kojih su dobijeni poluserijski rezovi debljine 4 μm . Nakon deparafinizacije, preparati su obojeni rutinskom metodom hematoksilin-eozin (HE). Preparati obojeni HE metodom analizirani su svjetlosnim mikroskopom i korišćeni su za određivanje tipa adenokarcinoma pluća i njegovih histoloških karakteristika.



Za potrebe IHH analize, reprezentativni uzorci tkiva prethodno fiksirani u 10% neutralnom puferovanom formalinu i ukalupljeni u parafin isječeni su na rezove debljine 4 μm . Imunohistohemijsko bojenje izvršeno je potpuno automatizovanim postupkom na platformama Ventana BenchMark GX i Ventana BenchMark Ultra (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), uz strogo poštovanje standardizovanih protokola proizvođača. Procesi deparafinizacije, rehidratacije i demaskiranja antigena (primjenom Cell Conditioning 1 rastvora) obavljani su unutar samih uređaja primjenom kontrolisane toplotne obrade, čime je obezbijeđena maksimalna reproduktivnost rezultata. Blokada endogene peroksidaze izvršena je upotrebom odgovarajućeg inhibitora u trajanju od 4 minute. U dijagnostičkom panelu korištena su originalna Roche/Ventana gotova (Ready-to-Use) primarna antitijela: TTF-1 (klon SP141), p40 (klon BC28), napsin A (klon MRQ-60), sinaptofizin (klon SP11) i hromogranin A (klon LK2H10). Za detekciju imunog kompleksa primijenjen je ultraView Universal DAB Detection Kit, multimerski detekcioni sistem zasnovan na peroksidazi hrena (HRP). Vizualizacija reakcije postignuta je upotrebom hromogenog supstrata 3,3'-diaminobenzidina (DAB), dok je kontrastiranje preparata izvršeno hematoksilin II bojom uz naknadnu primjenu reagensa za plavljenje (eng. *Bluing Reagent*). Nakon završetka automatskog bojenja, preparati su dehidrisani u rastućim koncentracijama alkohola, prosvijetljeni u ksilolu i montirani u trajni medijum. Evaluacija imunohistohemijske reakcije izvršena je svjetlosnim mikroskopom.

Kod dva pacijenta u grupi ispitanika sa prethodno dijagnostikovanim primarnim malignitetima (adenokarcinom kolona i svjetloćelijski karcinom bubrega), novootkrivena promjena u plućima pokazala je TTF-1 pozitivnost, uz odsustvo ekspresije specifičnih imunohistohemijskih markera karakterističnih za primarnu lokalizaciju u kolonu i bubregu. Ovakav profil potvrdio je dijagnozu sinhronog ili metahronog primarnog

adenokarcinoma pluća (NSCLC), isključujući metastatsku prirodu bolesti. Kod jednog pacijenta sa profilom TTF-1 negativan/p40 negativan, ali uz dokazanu CK7 pozitivnost, dijagnoza primarnog NSCLC postavljena je nakon što je opsežnom radiološkom i kliničkom obradom isključeno postojanje primarnog tumora na drugim anatomskim lokalizacijama.

U kontrolnoj grupi jedan pacijent je imao prethodno postavljenu dijagnozu skvamocelularnog karcinoma grkljana.

Imunohistohemijska analiza ROS1 ekspresije izvedena je na automatizovanom sistemu Ventana BenchMark ULTRA primjenom gotovog (Ready-to-Use) zečijeg monoklonskog antitijela, klon SP384 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Tkivni rezovi debljine 4 μm su deparafinizovani, nakon čega je izvršeno demaskiranje antigena korišćenjem Cell Conditioning 1 (CC1) pufera u trajanju od 64 minute. Svaka serija bojenja uključivala je eksternu pozitivnu kontrolu (pneumociti u alveolarnom plućnom tkivu), dok su rezidualni pneumociti služili kao unutrašnja kontrola. Intenzitet citoplazmatskog bojenja ocjenjivan je primjenom semikvantitativnog scoring sistema u rasponu od 0 do 3+ (H-score uz semikvantitativnu procjenu intenziteta od 0 do 3+).

Za potrebe određivanja PD-L1 statusa, reprezentativni blokovi tumorskog tkiva fiksirani u 10% neutralnom puferovanom formalinu isječeni su na rotacionom mikrotomu na debljinu od 4 μm . Analiza je sprovedena primjenom dva klinički validirana imunohistohemijska esejja na odgovarajućim automatizovanim platformama, uz striktno pridržavanje protokola proizvođača. Jedan dio uzoraka analiziran je korišćenjem Dako PD-L1 IHH 22C3 pharmDx esejja (Agilent Technologies, Carpinteria, CA) na Dako Autostainer Link 48 sistemu. Ovaj postupak je obuhvatio automatizovanu deparafinizaciju i termičko demaskiranje antigena u PT Link modulu primjenom EnVision FLEX Target Retrieval rastvora niskog pH na temperaturi od 97°C u trajanju od 20 minuta, nakon čega je



uslijedila vizualizacija upotrebom EnVision FLEX detekcionog sistema. Drugi dio uzoraka obrađen je primjenom VENTANA PD-L1 (SP263) zečijeg monoklonskog antitijela na platformama Ventana BenchMark GX i Ventana BenchMark Ultra (Roche Diagnostics, Tucson, AZ). Ovaj protokol podrazumijevao je automatsku deparafinizaciju i termičko demaskiranje antigena korišćenjem Cell Conditioning 1 (CC1) pufera na 100°C u trajanju od 64 minute, dok je detekcija imunog kompleksa izvršena upotrebom OptiView DAB IHH Detection Kita. Interpretacija rezultata vršena je svjetlosnim mikroskopom od strane patologa koji je završio trening za interpretaciju rezultata PD-L1 testiranja za NSCLC izračunavanjem Tumor Proportion Score (TPS). TPS je definisan kao procenat od najmanje 100 vijabilnih tumorskih ćelija koje pokazuju djelimičnu ili potpunu membransku pozitivnost bilo kog intenziteta, dok citoplazmatsko bojenje i ekspresija u ćelijama imunog odgovora nisu uzimani u obzir prilikom scoringa. Prema nivou ekspresije, pacijenti su stratifikovani u tri kategorije: negativna ekspresija (TPS < 1%), niska pozitivna ekspresija (TPS 1–49%) i visoka pozitivna ekspresija (TPS ≥ 50%). Za svaku seriju bojenja korištene su validirane eksterne pozitivne kontrole (tkivo tonzile i placentе) uz odgovarajuće negativne kontrole radi potvrde specifičnosti hromogenog signala. Nakon završenog bojenja, preparati su dehidrisani, prosvijetljeni i montirani u trajni medijum za mikroskopsku analizu.

Kod svih pacijenata ispitivane i kontrolne grupe prije ROS1 testiranja je urađeno testiranje na prisustvo mutacija na EGFR genu i ALK testiranje i kod obe skupine analiziranih pacijenata je isključeno postojanje EGFR i ALK mutacija.

Molekularno testiranje na prisustvo mutacija u EGFR genu (egzoni 18–21) izvršeno je primjenom metode lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (Real-Time PCR). Izolacija dezoksiribonukleinske kiseline (DNA) iz uzoraka tkiva fiksiranih u formalinu i ukalupljenih u parafin (FFPE)

sprovedena je upotrebom cobas DNA Sample Preparation Kita prema uputstvima proizvođača. Detekcija mutacija izvršena je pomoću cobas EGFR Mutation Test v2 eseja (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) na instrumentu cobas z 4800 Analyzer. Analiza i interpretacija dobijenih rezultata obavljena je automatski korišćenjem cobas 4800 softvera, čime je osigurana visoka specifičnost i osjetljivost u detekciji klinički relevantnih mutacija.

ALK testiranje je rađeno imunohistohemijskom metodom na VentanaBenchMarkGx i VentanaBenchMark Ultra RocheD5F3 antitijelom.

Nije rađena kompletna genetička dijagnostika na prisustvo pokretačkih mutacija prema preporučenim NCCN smjernicama koje uključuju EGFR, ALK, ROS1, BRAF, KRAS, RET, MET, HER-2, NTRK.

Svim pacijentima koji su ušli u studiju u terapiju je uključen ICIs bilo samostalno, bilo u kombinaciji sa hemoterapijom i radioterapijom. Hemoterapija i radioterapija su korišteni u dozama i trajanju u skladu sa preporukama. Tačno je definisano vrijeme početka i vrijeme završetka terapije kao i broj primijenjenih ciklusa.

Statistička obrada podataka

Svi podaci su pohranjeni u elektronsku bazu podataka, kreiranu specifično za ovo istraživanje. Svakom pacijentu je dodijeljena jedinstvena šifra radi zaštite privatnosti i obezbjeđivanja anonimnosti, u skladu sa principima etičkog postupanja sa medicinskim podacima. Baza je obuhvatila demografske varijable (starost, pol, pušački status), kliničke parametre (datum dijagnoze, stadijum bolesti, vrsta uzorka, histološki tip), te specifične biomarkere (PD-L1 TPS, ROS1 status). Takođe, evidentirani su detalji o primijenjenoj terapiji inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka (ICIs), uključujući datum početka i završetka tretmana, broj primljenih ciklusa, te podatke o ukupnom preživljavanju preračunatom do kraja marta 2026. godine.



Rezultati su prikazani numerički, tabelarno i grafički. Statistička analiza sprovedena je upotrebom deskriptivnih i analitičkih metoda. Kvalitativne varijable su prikazane apsolutnim frekvencijama i procentima. Kvantitativni podaci su predstavljeni aritmetičkom sredinom sa pripadajućom standardnom devijacijom ($\bar{x} \pm SD$) ili medijanom sa interkvartilnim rasponom, zavisno od tipa raspodjele. Normalnost distribucije testirana je

Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Analiza preživljavanja izvršena je Kaplan-Meierovom metodom. Statistički značajnom smatrana je vrijednost $p < 0,05$. Kompletan obrada podataka izvršena je u softverskom paketu IBM SPSS Statistics v26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

REZULTATI

U tabeli 1 je prikaz parametara za svakog pacijenta koji je uključen u studiju u grupu ispitanika.

Tabela 1. Parametri za pacijente uključene u grupu ispitanika

Broj pacijenta	Godine	Pol	Pušački status	Stadijum bolesti	Vrsta uzorka	Histološki tip	Terapija	ROS	PD-L1 (%)	Preživljavanje – mjeseci
1	43	Ženski pol	Bivši pušač	IVB	Biopsija bronha	Adenokarcinom	Liječenje	1	55 %	10
2	65	Muški pol	Pušač	IIIC	Perkutana biopsija	NSCLC	Liječenje	1	90 %	13
3	63	Muški pol	Bivši pušač	IVA	Biopsija bronha	Adenokarcinom	Liječenje	2	100 %	41
4	75	Ženski pol	Pušač	IVA	Biopsija bronha	Adenokarcinom	Liječenje	1	80 %	32
5	70	Muški pol	Bivši pušač	IVA	Perkutana biopsija	Adenokarcinom	Liječenje	1	80 %	14
6	74	Muški pol	Pušač	IVA	Perkutana biopsija	Adenokarcinom	Liječenje	1	85 %	5
7	71	Muški pol	Bivši pušač	IIIB	Perkutana biopsija	Adenokarcinom	Liječenje	1	90 %	35
8	77	Muški pol	Bivši pušač	IVA	Perkutana biopsija	Adenokarcinom	Naivni	1	80 %	35
9	66	Ženski pol	Pušač	IVB	Perkutana biopsija	Adenokarcinom	Liječenje	1	60 %	34

U grupu ispitanika je uključeno 9 pacijenata od kojih je 6 osoba muškog pola i 3

osobe ženskog pola (tabela 1). Najmlađi pacijent je imao 43 godine, a najstariji 77



godina u trenutku postavljanja dijagnoze. Prosječna starost ispitanika iznosila je $67,11 \pm 9,94$ godina, sa medijanom od 70 godina. Većina pacijenata je bila starosti od 64 do 74,5 godine.

U tabeli 2 je prikaz parametara za svakog pacijenta koji je uključen u studiju u kontrolnu grupu.

Tabela 2. Parametri za pacijente uključene u kontrolnu grupu

Broj pacijenta	Godine	Pol	Pušački status	Stadijum bolesti	Vrsta uzorka	Histološki tip	Terapija	ROS1	PD - L1 (%)	Preživljavanje - mjeseci
1	60	Muški pol	Pušač	IVA	Parijetalna pleura	Adenokarcinom	Liječenje	Negativan	70 %	19
2	69	Muški pol	Nepušač	IVB	Biopsija bronha	Adenokarcinom	Liječenje	Negativan	60 %	60
3	66	Muški pol	Pušač	IVB	Nepoznato	Adenokarcinom	Naivni	Negativan	60 %	30
4	69	Muški pol	Bivši pušač	IVA	Perkutana biopsija	Adenokarcinom	Liječenje	Negativan	70 %	21
5	70	Ženski pol	Pušač	IVB	Nepoznato	Adenokarcinom	Liječenje	Negativan	80 %	13
6	72	Ženski pol	Pušač	IVB	Perkutana biopsija	Adenokarcinom	Liječenje	Negativan	70 %	57
7	55	Ženski pol	Pušač	IVB	Metastaza u mozak	Adenokarcinom	Liječenje	Negativan	60 %	10
8	59	Muški pol	Pušač	IVB	Limfni čvor	Adenokarcinom	Liječenje	Negativan	65 %	13
9	50	Muški pol	Pušač	IVA	Biopsija bronha	Adenokarcinom	Naivni	Negativan	95 %	46

U kontrolnu grupu je uključeno 9 pacijenata od kojih je 6 osoba muškog pola i 3 osobe ženskog pola (tabela 2). Najmlađi pacijent je imao 50 godina, a najstariji 72 godina u trenutku postavljanja dijagnoze.

Prosječna starost ispitanika iznosila je $63,33 \pm 7,58$ godina, sa medijanom od 66 godina. Većina pacijenata je bila starosti od 60 do 72 godine.

Tabela 3. Kliničko – patološke karakteristike ROS1 pozitivnih pacijenata (n = 9).

POL (n = 9)	ROS1 POZITIVNI PACIJENTI	KONTROLNA GRUPA
Muški pol	6 (66.67 %)	6 (66.67 %)
Ženski pol	3 (33.33 %)	3 (33.33 %)
PUŠAČKI STATUS (n = 9)		
Pušač	4 (44.44 %)	7 (77.78 %)
Nepušač	0	1 (11.11 %)
Bivši pušač	5 (55.56 %)	1 (11.11 %)
STADIJUM BOLESTI (n = 9)		
IIIA	0	0
IIIB	1 (11.11 %)	0
IIIC	1 (11.11 %)	0
IVA	5 (55.56 %)	3 (33.33 %)
IVB	2 (22.22 %)	6 (66.67 %)
TRETMAN		
Pacijenti koji prethodno nisu tretirani drugim terapijskim modalitetima osim ICIs	1 (11.11 %)	2 (22.22 %)
Pacijenti koji su liječeni nekim drugim terapijskim modalitetom pored ICIs	8 (88.89 %)	7 (77.78 %)

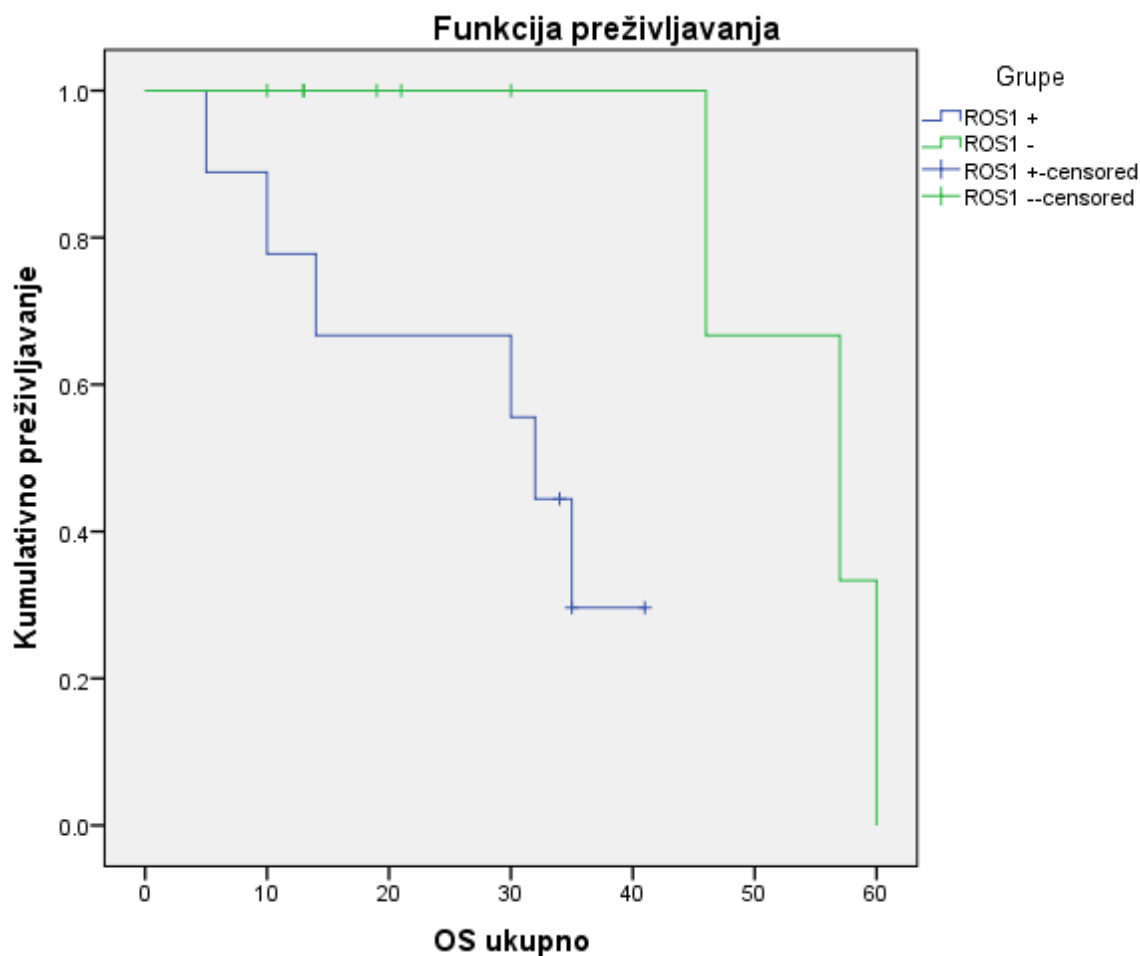
U obje grupe (ROS1 pozitivni pacijenti i kontrolna grupa) polna distribucija je bila identična: muškarci su činili 66,67% (6/9), dok su žene činile 33,33% (3/9).

Što se tiče pušačkog statusa, među ROS1 pozitivnim pacijentima bilo je 44,44% pušača (4/9), nije bilo nepušača, dok je 55,56% činilo bivše pušače (5/9). U kontrolnoj grupi dominirali su pušači sa 77,78% (7/9), nepušači su činili 11,11% (1/9), kao i bivši pušači 11,11% (1/9).

Prema stadijumu bolesti, u ROS1 pozitivnoj grupi nije bilo pacijenata u stadijumima IIIA i IIIB, dok je po jedan pacijent (11,11%) bio u stadijumima IIIB i IIIC. Najveći broj pacijenata bio je u

stadijumu IVA (55,56%; 5/9), dok je 22,22% (2/9) bilo u stadijumu IVB. U kontrolnoj grupi nije bilo pacijenata u stadijumima IIIA, IIIB i IIIC, dok je 33,33% (3/9) bilo u stadijumu IVA, a 66,67% (6/9) u stadijumu IVB.

U pogledu tretmana, među ROS1 pozitivnim pacijentima 11,11% (1/9) nije prethodno liječen radioterapijskim ili hemoterapijskim modalitetima osim imunoterapije (ICIs), dok je većina od 88,89% (8/9) bila liječena radioterapijskim i/ili hemoterapijskim modalitetima pored ICIs. U kontrolnoj grupi 22,22% (2/9) pacijenata nije prethodno liječeno radioterapijskim ili hemoterapijskim modalitetima, dok je 77,78% (7/9) bilo liječeno radioterapijskim i/ili hemoterapijskim modalitetima pored ICIs.



Grafikon 1. Kaplan-Meier-ove krivulje ukupnog preživljavanja (Overall Survival) pacijenata sa visokom ekspresijom PD-L1 ($\geq 50\%$) liječenih inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka (ICIs), stratifikovanih prema ROS1 statusu (ispitivana grupa: ROS1 1+/2+; kontrolna grupa: ROS1 0).

U trenutku prestanka praćenja preživljavanja tri pacijenta i iz ispitivane i iz kontrolne grupe su bili živi.

Poređenjem krivulja preživljavanja primjenom Log-Rank (Mantel-Cox) testa utvrđena je statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju između ispitivanih grupa ($\chi^2 = 5,407$; $df = 1$; $p = 0,020$). Pacijenti u ROS1 pozitivnoj grupi pokazali su statistički značajno kraće preživljavanje u poređenju sa pacijentima u ROS1 negativnoj grupi.

Naši rezultati ukazuju na to da pacijenti sa ROS1 pozitivnim tumorima imaju kraće ukupno preživljavanje kada se imunoterapija primjenjuje u prvoj liniji liječenja, uprkos visokoj ekspresiji PD-L1. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima (npr. IMMUNOTARGET kohorta) koji sugeriraju da

onkogene pokretačke mutacije poput ROS1 mogu modulirati tumorsku mikrookolinu čineći je manje osjetljivom na inhibitore imunoloških kontrolnih tačaka (16).

DISKUSIJA

Glavni fokus ovog istraživanja bio je evaluacija uticaja ROS1 proteinske ekspresije na ukupno preživljavanje pacijenata uznapredovalim stadijumom NSCLC koji su liječeni ICIs. Iako je visoka ekspresija PD-L1 ($TPS \geq 50\%$) opšteprihvaćeni biomarker za dobar terapijski odgovor na imunoterapiju, naši rezultati ukazuju na postojanje značajnih razlika u preživljavanju unutar ove podgrupe pacijenata, zavisno od prisustva ROS1 proteina (17).

Najznačajniji nalaz naše studije je statistički značajno kraće ukupno



preživljavanje pacijenata sa slabo i umjereno ROS1 pozitivnim tumorima u poređenju sa kontrolnom grupom u kojoj nije detektovana ROS1 proteinska pozitivnost ($p = 0,020$), uprkos činjenici da su svi pacijenti imali visoku ekspresiju PD-L1. Ovaj nalaz je u skladu sa literaturnim podacima koji sugerišu da prisustvo onkogenih dražvera, poput ROS1 fuzija ili nekih drugih pokretačkih mutacija, može modulirati tumorsku mikrookolinu čineći je manje osjetljivom na dejstvo ICIs. Studije poput IMMUNOTARGET kohorte već su ukazale na to da pacijenti sa ROS1 translokacijama često imaju lošiji odgovor na imunoterapiju u poređenju sa pacijentima koji nemaju identifikovane pokretačke mutacije(16).

Fenomen visoke PD-L1 ekspresije uz istovremeno loš odgovor na imunoterapiju kod ROS1 pozitivnih pacijenata može se objasniti mehanizmom "konstitutivne" nasuprot "indukovane" ekspresije PD-L1. Kod tumora sa pokretačkim mutacijama, aktivacija signalnih puteva (poput JAK/STAT ili MAPK/ERK) može direktno uzrokovati membransku ekspresiju PD-L1 nezavisno od prisustva inflamacije ili reakcije imunog sistema prisustvo tumorskih ćelija (18)(19).

Dok klasične studije poput onih koje su sprovedi Jain i saradnici (2019) te Dyrbeek i saradnici (2023) naglašavaju povezanost ROS1 fuzija sa mlađim nepušačima ženskog pola, naši rezultati pokazuju prisustvo ROS1 ekspresije kod starijih muškaraca (66.67%) pušača sa prosječnom starošću od 67,11 godina u ispitivanoj grupi(7). Ovo je u skladu sa novijim istraživanjima Greniera i saradnika (2023), koja sugerišu da IHH detekcija ROS1 proteina može obuhvatiti širi spektar pacijenata van strogo definisanog kliničkog profila za genske translokacije. Ovakva distribucija može biti odraz specifičnosti naše populacije, ali i činjenice da smo analizirali pacijente sa niskom (1+) i umjerenom (2+) IHH ekspresijom ROS1, koja se može javiti i van klasičnog profila mlađih nepušača.

Ograničenje ove studije predstavlja mali broj ispitanika ($n = 18$) i retrospektivni

karakter istraživanja. Ipak, dobijeni rezultati jasno sugerišu da bi ROS1 ekspresiju, utvrđenu rutinskom imunohistohemijom, trebalo uzeti u obzir kao negativni prediktivni faktor za primjenu imunoterapije u prvoj liniji liječenja, čak i kada je PD-L1 skor visok. Ovi pacijenti bi potencijalno imali veću korist od rane primjene ciljane terapije inhibitorima tirozin-kinaze (TKI), dok bi imunoterapiju trebalo rezervisati za kasnije linije liječenja ili u kombinovanim protokolima.

ZAKLJUČAK

U zaključku, naše istraživanje potvrđuje da heterogenost NSCLC zahtijeva sveobuhvatan biomarker pristup. Samo određivanje PD-L1 statusa nije dovoljno za precizno predviđanje terapijskog odgovora kod pacijenata sa potencijalnim onkogenim dražverima kao što je ROS1.

LITERATURA

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M. Global Cancer Observatory: Cancer Today. ŠOnlineĆ.; 2024. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>, accessed.
2. Cheng Y, Yang JC, Okamoto I et al. Pembrolizumab plus chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer without tumor PD-L1 expression in Asia. *Immunotherapy*. 2023 Sep; 15(13): 1029-1044.
3. Chevallier M, Borgeaud M, Addeo A, Friedlaender A.. Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future. *World J Clin Oncol*. 2021. April; 12(4): 217-237.
4. Grenier K, Rivière JB, Bencheikh BOA, Corredor ALG, Shieh BC, Wang H, et al. Routine clinically detected increased ROS1 transcripts are related with ROS1 expression by immunohistochemistry and associated with EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *JTO Clinical and*



- Research Reports. 2023. May; 4(7).
5. Jain J, Chinta D, Jayaraman UB, Pathak N, Kaur M, Chatterjee S, et al. Determination of ROS1 positivity by immunohistochemistry. *Cancer Res Stat Treat*. 2019;; 16-20.
 6. Seegobin K, Majeed U, Wiest N, Manochakian R, Lou Y, Zhao Y. Immunotherapy in Non-Small cell lung cancer with actionable mutations other than EGFR. *Frontiers in Oncology*. 2021 Dec; 1(11).
 7. Dyrbekk APH, Warsame AA, Suhrke P, Ludahl MO, Moe JO, Eide IJZ, et al. Evaluation of ROS1 expression and rearrangements in a large cohort of early-stage lung cancer. *Diagn Pathol*. 2023 May; 18(1).
 8. Parisi F, Rossi G, Biello F, Tagliamento M, Barletta G, Zullo L, et al. Precision Cancer Medicine. *ŠOnlineĆ.*; 2022. Šcited 2026. March 10.03,2026. Available from: <https://pcm.amegroups.org/article/view/7336/html>.
 9. Gandhi L RADGSEEFEDAFea. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018 April; 378(22): 2078–92.
 - 10 Liu W, Huo G, Chen P. Clinical benefit of pembrolizumab in treatment of first line non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of clinical characteristics. *BMC Cancer*. 2023 May; 23(1).
 - 11 Cruz-Rico G, Avilés-Salas A, Popa-Navarro X, Lara-Mejía L et al. Association of Lung Adenocarcinoma Subtypes According to the IASLC/ATS/ERS Classification and Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Tumor Cells. *Pathol Oncol Res*. 2021. Apr; 27: 1532-2807.
 - 12 Büttner R, Gosney JR, Skov BG et al. . Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry Testing: A Review of Analytical Assays and Clinical Implementation in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2017 Dec; 35(34): 3867-3876.
 - 13 Olivares-Hernández A, Figuero-Pérez L, . Miramontes-González JP et al. Immune System Disorders, Cancer and Viral Infections: A New Treatment Opportunity for the Immune Checkpoint Inhibitors. *Life*. 2021 Dec; 11(12): 1400.
 - 14 National Comprehensive Cancer Network. . NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Non-Small Cell Lung Cancer. *ŠOnlineĆ.*; 2026 Šcited 2026 Apr 30. Available from: <https://www.nccn.org/guidelines>.
 - 15 Wang Y, Wang Y, Jin Y, Cai X, Shen X, . Zhou X, et al. A Comprehensive Study of ROS1 Fusion in Patients with Non Small-Cell Lung Cancer Using Novel ROS1 Immunohistochemistry Clone (SP384). *Clin Oncol*. 2023; 8(2005).
 - 16 Mazieres J, Drilon A, Lusque A, Mhanna L, Cortot AB, Mezquita L, et al. Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: results from the IMMUNOTARGET registry. *Ann Oncol*. 2019; 30(8): 1321-1328.
 - 17 A. T. Long-term survival of patients with . advanced non-small cell lung cancer treated using immune checkpoint inhibitors. *Respir Investig*. 2024. Jan.; 62(1): 85-89.
 - 18 DM P. The blockade of immune . checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer ŠInternetĆ*. Mar 2012; 12(4): 452-464.
 - 19 Marzec M, Zhang Q, Goradia A, . Raghunath PN, Liu X, Paessler M, et al.

- Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). Proceedings of the National Academy of Sciences ŠInternetĆ. Dec 2008.; 105(52): 20852–7.
- 20 Wang W, Cheng G, Zhang G, Song Z.
· Evaluation of a new diagnostic immunohistochemistry approach for ROS1 rearrangement in non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2020 Jun; 146(224-229): 17.
- 21 Dyrbekk APH, Warsame AA, Suhrke P,
· Ludahl MO, Moe JO, Eide IJZ, et al. Evaluation of ROS1 expression and rearrangements in a large cohort of early-stage lung cancer. Diagnostic Pathology. 2023. May; 1(70): 18.
- 22 Fielder T, Butler J, Tierney G, Holmes M,
· Lam KY, Satgunaseelan L, et al. ROS1 rearrangements in lung adenocarcinomas are defined by diffuse strong immunohistochemical expression of ROS1. Pathology. 2021 Oct; 54(4): 399-403.
- 23 Qin Q, Li B. Pembrolizumab for the
· treatment of nonsmall cell lung cancer: Current status and Future Directions. J Cancer Res Ther. 2019; 15(4): 743-750.
- 24 Chen T, Zhou F, Jiang W, et al. Age at
· diagnosis is a heterogeneous factor for non-small cell lung cancer patients. J Thorac Dis. 2019 Jun; 11(6): 2251-2266.
- 25 Blechter, B., Wong, J.Y.Y., Chien, L.H. et
· al. Age at lung cancer diagnosis in females versus males who never smoke by race and ethnicity. Br J Cancer. 2022 Feb; 130(8): 1286–1294.
- 26 Chien LH, Jiang HF, Tsai FY, et al.
· Incidence of Lung Adenocarcinoma by Age, Sex, and Smoking Status in Taiwan. JAMA Netw Open. 2023 Nov; 6(11): e2340704.
- 27 Yoneda K, Imanishi N, Ichiki Y, Tanaka F.
· Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). J UOEH. 2018. Jun; 40(20): 173-189.
- 28 Xia L, Liu Y, Wang Y. PD-1/PD-L1
· Blockade Therapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Current Status and Future Directions. Oncologist. 2019 Feb; 24(Suppl 1): S31-S41.
- 29 Theelen WSME, Chen D, Verma V, et al.
· Pembrolizumab with or without radiotherapy for metastatic non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of two randomised trials. Lancet Respir Med.. 2021 Mar; 9(5): 467-475.
- 30 Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson
· AG et al. Updated analysis of KEYNOTE-024: pembrolizumab versus platinum-based chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score of 50% or greater. J Clin Oncol. 2019. Mar.; 37(7): 537-546.
- 31 Li JJN, Karim K, Sung M, et al. Tobacco
· exposure and immunotherapy response in PD-L1 positive lung cancer patients. Lung Cancer. 2020. Dec.; 150: 159-163.
- 32 Zaleskis G, Pasukoniene V, Characiejus D,
· et al. Do the benefits of being a smoker hint at the existence of PD-1/PD-L1 sensitizers for patients on single-agent immunotherapy? Journal for ImmunoTherapy of Cancer.. 2021. Aug.; 9(8): e003191.



ABSTRACT Introduction: Although immune checkpoint inhibitors (ICIs) have significantly improved survival in patients with lung cancer and high PD-L1 expression (TPS $\geq$ 50%), the therapeutic response within this group remains heterogeneous. This study aimed to investigate how low and moderate ROS1 protein expression affects the overall survival (OS) of patients receiving immunotherapy as their primary treatment modality. **Methods:** The study was designed as a retrospective, observational analysis including 18 patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), stages III and IV, treated at the University Clinical Centre of the Republic of Srpska. Patients were divided into two groups. The first group was the experimental group (n=9) with patients with immunohistochemically (IHC) confirmed low (1+) or moderate (2+) ROS1 protein expression (clone SP384) and control group (n=9) with patients who were ROS1-negative. A common criterion for both groups was high PD-L1 expression (TPS $\geq$ 50%). Survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method with the Log-Rank test. **Results:** Survival analysis revealed a statistically significant difference between the groups ($\chi^2 = 5.407$; df= 1; p = 0,020). Despite high PD-L1 status, patients with ROS1-positive tumors achieved significantly shorter overall survival compared to the control group. **Conclusion:** Immunohistochemical detection of the ROS1 protein, even at low staining intensities, represents a significant negative predictive factor for the success of immunotherapy in patients with NSCLC. These findings indicate that patients with any degree of ROS1 expression might derive greater clinical benefit from the early administration of targeted tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy compared to standard immunotherapy. **Keywords:** NSCLC, ROS1, PD-L1, immunotherapy, overall survival.

*Zavod za kliničku patologiju, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

†Katedra za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

‡Klinika za plućne bolesti, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

§Katedra za internu medicinu, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

§ Centar za radioterapiju Affidea, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

**Katedra za onkologiju i radioterapiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

† Klinika za torakalnu hirurgiju, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

††Katedra za hirurgiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

Autor za korespondenciju:

Liljana Tadić-Latinović

E-mail: lj.tadic@yahoo.com